



Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 199 53 206.0

Anmeldetag: 5. November 1999

Anmelder/Inhaber: Degussa-Hüls AG, Frankfurt am Main/DE

Bezeichnung: Plasmide aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Verwendung

IPC: C 12 N, C 12 P

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 31. August 2000
Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident
Im Auftrag

AGH

Plasmide aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Verwendung

Gegenstand der Erfindung sind die neuen Plasmide pTET3 und
5 pCRY4 und deren Verwendung zur Herstellung von
Vektorplasmiden.

Stand der Technik

Natürlich vorkommende Plasmide und aus diesen hergestellte
Plasmidvektoren sind eine wichtige Voraussetzung für die
10 Verbesserung der Produktionseigenschaften von coryneformen
Bakterien. Die Konstruktion von Plasmidvektoren für diese
Gruppe industriell bedeutender Bakterien basiert im
wesentlichen auf kryptischen Plasmiden, die mit geeigneten,
in Corynebakterien oder Brevibakterien funktionsfähigen
15 Selektionsmarkern ausgestattet werden (US-A 5,158,891 und
US-A 4,500,640). Diese Plasmidvektoren können zur
Klonierung und Verstärkung von Genen, die an der Produktion
von L-Aminosäuren, Vitaminen oder Nukleotiden beteiligt
sind, eingesetzt werden. Durch die Expression der
20 jeweiligen Gene kann die Produktion der gewünschten Stoffe
positiv beeinflusst werden. So führte z. B. die Klonierung
eines DNA-Fragmentes, das ein Protein für einen Lysin-
Exporter kodiert, zu einer Verbesserung der fermentativen
Produktion von L-Lysin mit *Corynebacterium glutamicum* Stamm
25 MH20-22B (DE-A 19548222).

Im Gegensatz zu dem bekannten und industriell gleichermaßen
bedeutsamen Bakterium *Escherichia coli* steht für
Corynebakterien und Brevibakterien nur eine begrenzte
Anzahl von natürlichen Plasmiden und geeigneten
30 Selektionsmarkern für die Entwicklung von Klonier- und
Expressionsvektoren zur Verfügung. Viele der bekannten und

mit einem gesonderten Namen versehenen Plasmide erwiesen sich bei näherer Analyse ihrer genetischen Organisation als identisch. Diese Plasmidisolate wurden daher in zwei Plasmidgruppen zusammengefaßt (Sonnen et al., Gene 107, 69-
5 74 (1991)).

Zur pBL1-Gruppe gehören die Plasmide pAM286 aus *Corynebacterium glutamicum* AJ11560 (EP-A 0093611), pAM330 aus *Brevibacterium lactofermentum* ATCC13869 (Miwa et al., Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903
10 (1984)), pX18 aus *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21086 (Yeh et al., Gene 47, 301-308 (1986)) und pBL1 aus *Brevibacterium lactofermentum* ATCC21798 (Santamaria et al., Journal of General Microbiology 130, 2237-2246 (1984)).

Die pHM1519-Gruppe umfaßt die Plasmide pCG1 aus
15 *Corynebacterium glutamicum* ATCC31808 (US-A 4,617,267), pHM1519 aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13058 (Miwa et al., Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)), pSR1 aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC19223 (Yoshihama et al., Journal of Bacteriology 162, 591-597
20 (1985)) und pRN3.1 aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC39269 (US-A 4,559,308).

Neben Mitgliedern dieser beiden Plasmidgruppen wurden noch die kryptischen Plasmide pCG2 aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC31832 (US-A 4,489,160) und pAG3 aus
25 *Corynebacterium melassecola* 22220 (US-A 5,158,891) isoliert.

Selektionssysteme stehen bislang lediglich in Form von zwei Antibiotikum-Resistenzmarkern zur Verfügung, die auf dem Streptomycin-/Spectinomycin-Resistenzplasmid pCG4 aus
30 *Corynebacterium glutamicum* ATCC31830 (US-A 4,489,160) und

auf dem Tetracyclin-Resistenzplasmid pAG1 aus
Corynebacterium melassecola 22243 (US-A 5,158,891)
identifiziert wurden. Plasmid pCG4 trägt außerdem das
Sulfamethoxazolresistenz vermittelnde sulI-Gen, dessen
5 Sequenz von Nesvera et al. (FEMS Microbiology Letters 169,
391-395 (1998)) bestimmt wurde.

Für die schnelle Untersuchung und Verbesserung von Stämmen,
die Aminosäuren, Vitamine oder Nukleotide produzieren, ist
es wichtig, Plasmidvektoren zu besitzen, die miteinander
10 kompatibel sind und eine ausreichend hohe Stabilität
besitzen.

Aus dem Stand der Technik ist bekannt, daß pHM1519-
Plasmidderivate und pBL1-Plasmidderivate koexistieren
können. Außerdem ist bekannt, daß die in US-A 5,175,108
15 beschriebenen Plasmide pGA1 und pGA2 kompatibel sind.

Weiterhin sind Plasmidvektoren von Bedeutung, die hohe,
mittlere oder niedrige Kopienzahlen aufweisen, um so eine
abgestufte Expression des interessierenden Gens einstellen
zu können. Die meisten der bekannten Plasmide besitzen eine
20 hohe Kopienzahl. Lediglich von dem in der US-A 5,175,108
beschriebenen Plasmid pGA2 ist eine niedrige Kopienzahl
bekannt.

Die landläufig eingesetzten Plasmidvektoren sind
zusammengesetzt aus Komponenten, die aus der Spezies C.
25 glutamicum und Komponenten einer anderen Bakterienspezies,
typischerweise E. coli stammen. Durch diese Vorgehensweise
wird artfremde DNA in die Spezies C. glutamicum eingeführt.
Funktionsfähige Plasmidvektoren mit abgestufter Kopienzahl,
die nur arteigene DNA enthalten und somit Kriterien der
30 Selbstklonierung entsprechen sind in der Fachwelt nicht

bekannt.

Aufgabe der Erfindung

Die Erfinder haben sich zur Aufgabe gestellt, neue Plasmide, die für die Konstruktion von Plasmidvektoren mit
5 verbesserten Eigenschaften geeignet sind, für Aminosäure-, Vitamin- und Nukleotid-produzierende coryneforme Bakterien bereitzustellen.

Beschreibung der Erfindung

Aminosäuren, Vitamine und Nukleotide finden in der
10 Tierernährung, in der Lebensmittelindustrie, in der pharmazeutischen Industrie und in der Humanmedizin Anwendung. Diese Stoffe werden mit Stämmen coryneformer Bakterien produziert. Zur Verbesserung der Produktionseigenschaften werden geeignete Gene mittels
15 Plasmidvektoren verstärkt. Es besteht daher ein allgemeines Interesse, neue Plasmidvektoren mit verbesserten Eigenschaften zur Verfügung zu stellen.

Gegenstand der Erfindung sind die miteinander kompatiblen Plasmide pTET3 und pCRY4, isoliert aus dem unter der DSM-
20 Nummer 5816 hinterlegten Stamm von Corynebacterium glutamicum, wobei

1.1 das Plasmid pTET3 charakterisiert ist durch eine Länge von ~ 27,8 kbp und die in Abbildung 1 dargestellte Restriktionskarte, und eine Antibiotikaresistenzregion
25 und

1.2 das Plasmid pCRY4 charakterisiert ist durch eine Länge von ~ 48 kbp, und die in Abbildung 2 dargestellte Restriktionskarte.

Gegenstand der Erfindung sind ebenso zur autonomen Replikation in coryneformen Bakterien befähigte aus pTET3 und pCRY4 zusammengesetzte Plasmide (composite plasmids), enthaltend

- 5 2.1 einen Teil oder die Gesamtmenge der Nukleotidsequenzen
- 2.2 zumindest eine DNA-Replikationsregion, die sich von einem der Plasmide pTET3 oder pCRY4 ableitet (derived from)
- 10 2.3 gegebenenfalls ein Genfragment, das sich von einem Plasmid ableitet, das sich in E.coli, B.subtilis oder Streptomyces vermehren kann und
- 2.4 mindestens eine Region für die Expression einer Wirkstoffresistenz, bevorzugt aus dem Plasmid pTET3.

Gegenstand der Erfindung sind ebenfalls zusammengesetzte Plasmide, die aus den erfindungsgemäßen neuen Plasmiden
15 zumindest die Wirkstoffresistenz(en) und pGA1 und/oder pGA2 ganz oder zum Teil enthalten.

Das neue Plasmid pTET3, dessen Restriktionskarte in Abbildung 1 dargestellt ist, besitzt

- 20 1. eine Replikationsregion mit der Nukleotidsequenz dargestellt in SEQ-ID-No. 1 und
2. eine Antibiotikaresistenzregion, bestehend aus einem Tetracyclinresistenz-vermittelndem tetA-Gen und einem Streptomycin- und Spectinomycinresistenz-
- 25 vermittelnden aadA-Gen, dargestellt in SEQ-ID-No. 6.

Das neue Plasmid pCRY4, dessen Restriktionskarte in Abbildung 2 dargestellt ist, besitzt eine Replikationsregion mit der Nukleotidsequenz, dargestellt in SEQ-ID-No. 4 enthält.

Die Herstellung von Aminosäuren, Vitaminen und Nukleotiden unter Verwendung von Plasmidvektoren (composite plasmids), die pTET3- und pCRY4- und gegebenenfalls pGA1- oder pGA2-Nukleotidsequenzen enthalten, ist ebenso ein Gegenstand der
5 Erfindung.

Corynebacterium glutamicum LP-6, das im Rahmen der EP-B 0 472 869 als DSM5816 hinterlegt worden ist, enthält neben den dort beschriebenen Plasmiden pGA1 und pGA2 die neuen Plasmide pTET3 und pCRY4. Die Aufbewahrungszeit von DSM5816
10 ist gemäß Regel 9.1 des Budapester Vertrages verlängert worden.

Zur Darstellung der Plasmide pTET3 und pCRY4 wird der Stamm LP-6 in einem herkömmlichen Medium, wie z.B. Hirn-Herz-Bouillon oder Luria-Bertani-Medium, kultiviert. Die Zellen
15 werden durch Zentrifugation geerntet, mit Lysozym behandelt und mit der Methode der alkalischen Lyse aufgeschlossen. Die DNA wird anschließend durch Anionenaustauschchromatographie an Silikagelpartikeln gereinigt, mit Ethanol oder Isopropanol gefällt und
20 abschließend in H₂O resuspendiert. Vollständige Systeme zur Isolierung von Plasmid-DNA sind als sogenannte „Kits“ im Handel erhältlich. Ein Beispiel für einen derartigen „Kit“ ist der „Nucleobond Plasmid Kit“ der Firma Clontech Laboratories GmbH. Eine detaillierte Anleitung zur
25 Benutzung dieses „Kits“ findet der Fachmann im Handbuch „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges, User Manual (PT3167-1)“ der Firma Clontech Laboratories GmbH (Heidelberg, Deutschland, 1997). Durch Auftrennung der auf diese Weise gewonnenen Gesamtplasmid-DNA durch
30 Agarosegel-Elektrophorese und Färbung mittels Ethidiumbromid werden die Plasmide pTET3 und pCRY4 als sogenannte Plasmidbanden sichtbar. DNA des Plasmids pTET3

und DNA des Plasmids pCRY4 kann anschließend aus dem Agarosegel isoliert werden. Hierzu wird das Plasmid-DNA enthaltende Agarosegel mit einem chaotropen Reagenz versetzt, die in der entstehenden Lösung enthaltende
5 Plasmid-DNA an die Oberfläche von Glas- oder Silikagelpartikeln gebunden und anschließend von dieser Matrix wieder eluiert. Eine detaillierte Anleitung hierzu findet findet der Fachmann im Handbuch „QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“ der Firma Qiagen GmbH
10 (Hilden, Deutschland, 1997). Auf die beschriebene Weise gelingt es, pTET3- und pCRY4-DNA in reiner Form darzustellen.

DNA des zu untersuchenden Plasmids wird mit Restriktionsenzymen wie sie beispielsweise bei Roberts et
15 al. (Nucleic Acids Research 27, 312-313 (1999)) beschrieben sind einzeln oder in Kombinationen behandelt. Die entstehenden DNA-Fragmente werden durch Agarosegel-Elektrophorese aufgetrennt und die Restriktionsschnittstellen einander zugeordnet. Anleitungen
20 hierzu findet der Fachmann beispielsweise bei Rodriguez und Tait „Recombinant DNA Techniques: An Introduction“ (Addison-Wesley Publishing Company, London, 1983) oder im „Guide to Molecular Cloning Techniques“ herausgegeben von Berger und Kimmel (Methods in Enzymology, Vol. 152,
25 Academic Press, London, 1987). Auf diese Weise läßt sich die Länge des Plasmids bestimmen bzw. die Restriktionskarte aufstellen. Plasmid pTET3 hat eine Länge von ca. 27,8 kbp und ist in Abbildung 1 dargestellt. Plasmid pCRY4 hat eine Länge von ca. 48 kbp und ist in Abbildung 2 dargestellt.

30 Die Plasmide pTET3 und pCRY4 besitzen eine moderate bzw. niedrige Kopienzahl. Durch diese Eigenschaft ergänzen sie das Spektrum der bekannten Plasmide von Corynebacterium in

vorteilhafter Weise. Anleitungen zur Kopienzahlbestimmung finden sich beispielsweise bei Miwa et al. (Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)) und Vohradsky et al. (Electrophoresis 13, 601-612 (1993)).

- 5 Zur Gewährleistung einer einfachen Handhabbarkeit der Plasmide pTET3 und pCRY4 wird die für die Replikation zuständige DNA-Region der jeweiligen Plasmide bestimmt. Hierzu bedient man sich bekannter Plasmidvektoren von *Escherichia coli* wie beispielsweise pK18 (Pridmore, Gene
- 10 56, 309-312 (1987)), pK18mob2 (Tauch et al., Plasmid 40, 126-139 (1998)) oder pCR2.1 (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande), die in coryneformen Bakterien nicht replizieren können, deren Resistenzgen aber exprimiert wird. DNA der Plasmide pTET3 und pCRY4 wird isoliert und
- 15 mit Restriktionsenzymen behandelt. Wahlweise können wiederum einzelne der auf diese Weise entstandenen DNA-Fragmente isoliert werden. Die DNA der eingesetzten Plasmidvektoren wird mit den gleichen Restriktionsenzymen bzw. mit solchen behandelt, die kompatible Enden erzeugen.
- 20 Die erzeugten DNA-Moleküle werden gemischt und mit T4-DNA-Ligase behandelt. Diese sogenannten Kloniertechniken gehören zum Stand der Technik und sind beispielsweise in dem bekannten Handbuch von Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory
- 25 Press (1989)) detailliert beschrieben. Nach Transformation eines coryneformen Wirtes, z.B. *Corynebacterium glutamicum*, mit dem Ligationsgemisch und Selektion auf das Resistenzgen des eingesetzten *E. coli*-Plasmidvektors erhält man Transformanten. Anleitungen zur Transformation coryneformer
- 30 Bakterien findet man beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied and Environmental Microbiology 29, 356-362 (1988)), bei Liebl et al. (FEMS Microbiology Letters 65,

299-304 (1989)) oder bei Dunican et al. (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)). Die Plasmid-DNA dieser Transformanten enthält DNA-Segmente von pTET3 bzw. pCRY4, die zur Replikation in coryneformen Bakterien befähigen. Beispiele
5 hierfür sind:

- das Plasmid pTET3-Rep, das aus dem E. coli-Plasmid pK18mob2 und der Replikationsregion des Plasmids pTET3 (Abbildung 3) besteht, und
- das Plasmid pCRY4-Rep, das aus dem E. coli-Plasmid
10 pK18mob2 und der Replikationsregion des Plasmids pCRY4 (Abbildung 4) besteht.

Die auf diese Weise charakterisierten DNA-Abschnitte werden anschließend wiederum in gängige für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren subkloniert. Beispiele für derartige,
15 für die DNA-Sequenzierung geeignete Vektoren sind beispielsweise die Plasmide pGEM-5zf(-) oder pGEM-5zf(+) der Firma Promega Corporation (Promega Protocols and Application Guide, Second Edition, 1991, part number Y981, Promega Corporation, Madison, WI, USA), das Plasmid pUC19
20 (Yanish-Perron et al., Gene 33, 103-119 (1985)) oder das Plasmid pK18 (Pridmore, Gene 56, 309-312 (1987)).

Methoden zur DNA-Sequenzierung sind unter anderem bei Sanger et al. (Proceedings of the National of Sciences USA, 74, 5463-5467, 1977)) und bei Zimmermann et al. (Nucleic
25 Acids Research 18, 1067 (1990)) beschrieben.

Die erhaltenen DNA-Sequenzen können dann mit bekannten Algorithmen bzw. Sequenzanalyse-Programmen, wie z.B. dem „STADEN Computer-Softwarepaket“ (Molecular Biotechnology 5, 233-241 (1996)), dem GCG-Programm von Butler (Methods of
30 Biochemical Analysis 39, 74-97 (1998)), dem FASTA-

Algorithmus von Pearson und Lipman (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 85, 2444-2448 (1988)) oder dem BLAST-Algorithmus von Altschul et al. (Nature Genetics 6, 119-129 (1994)) untersucht und mit den in öffentlich
5 zugänglichen Datenbanken vorhandenen Sequenzeinträgen verglichen werden. Öffentlich zugängliche Datenbanken für Nukleotidsequenzen sind beispielsweise die der European Molecular Biologies Laboratories (EMBL, Heidelberg, Deutschland) oder die des National Center for Biotechnology
10 Information (NCBI, Bethesda, MD, USA).

Auf diese Weise wurde die neue für die Replikation des Plasmids pTET3 verantwortliche DNA-Sequenz erhalten, die als SEQ ID No. 1 Bestandteil der vorliegenden Erfindung ist, und die das für die Replikation zuständige repA-Gen
15 und das für die Stabilität zuständige parA-Gen trägt. Weiterhin wurden aus der vorliegenden DNA-Sequenz die Aminosäuresequenzen der kodierten Proteine abgeleitet. In SEQ ID No. 2 ist die sich ergebende Aminosäuresequenz des Stabilisierungsproteins ParA und in SEQ ID No. 3 die sich
20 ergebende Aminosäuresequenz des Replikationsproteins RepA von pTET3 dargestellt.

Weiterhin wurde auf diese Weise die neue für die Replikation des Plasmids pCRY4 verantwortliche DNA-Sequenz erhalten, die als SEQ ID No. 4 Bestandteil der vorliegenden
25 Erfindung ist, und die das für die Replikation von pCRY4 zuständige repA-Gen trägt. In SEQ ID No. 5 ist die abgeleitete Aminosäuresequenz des Replikationsproteins RepA des Plasmids pCRY4 dargestellt.

In Corynebacterium glutamicum sind natürlich vorkommende
30 Gene, die Resistenz gegen Antibiotika vermitteln, nur als Ausnahme bekannt. Um so überraschender war es für die

Erfinder festzustellen, daß das Plasmid pTET3 Resistenz gegen die Antibiotika Tetracyclin, Streptomycin, Spectinomycin und Sulfamethoxazol vermittelt.

Zur Identifizierung von Antibiotikum-Resistenzgenen auf neuen Plasmiden werden der zu untersuchende Stamm, im vorliegenden Fall *Corynebacterium glutamicum* LP-6, und ein sensitiver Kontrollstamm, im vorliegenden Fall *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032, zunächst auf Resistenz bzw. Sensitivität gegen verschiedene Antibiotika und Antibiotika-Konzentrationen geprüft. Hierzu bedient man sich vorzugsweise der experimentellen Vorschriften des „National Committee of Clinical Laboratory Standards“ (NCCLS) (Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically-fourth edition; Approved Standard, M7-A4, NCCLS 17(2), (1997)). Den Vorschriften der „Approved Standards M7-A4“ folgend lassen sich Hemmkonzentrationen ermitteln und somit Resistenzen des untersuchten Bakterienstammes identifizieren.

Anschließend wird das zu untersuchende Plasmid, im vorliegenden Fall pTET3, wie oben beschrieben aus Stamm LP-6 isoliert und zur Transformation eines geeigneten Kontroll- bzw. Indikatorstammes, im vorliegenden Fall Stamm ATCC13032, eingesetzt. Methoden zur Transformation coryneformer Bakterien sind beispielsweise bei Thierbach et al. (Applied and Environmental Microbiology 29, 356-362 (1988)), bei Liebl et al. (FEMS Microbiology Letters 65, 299-304 (1989)) oder bei Dunican et al. (Bio/Technology 7, 1067-1070 (1989)) beschrieben. Die Selektion erfolgt auf gängigen, komplexen Nährböden, wie z.B. Hirn-Herz-Bouillon oder Luria-Bertani-Medium, die mit den entsprechenden Antibiotika supplementiert werden. Das Antibiotikum und dessen Konzentration für diesen Selektionsvorgang wird mit

Hilfe der oben erwähnten „Approved Standards, M7-A4“ bestimmt. Auf diese Weise erhält man durch Selektion auf Tetracyclinresistenz den Stamm ATCC13032 [pTET3].

Anschließend wird die Resistenz/Sensitivität des Stammes

- 5 ATCC13032 [pTET3] und des Kontrollstammes ATCC13032 mit der oben zitierten Vorschrift untersucht, mit dem Ergebnis, daß der Stamm ATCC13032 [pTET3] resistent gegenüber den Antibiotika Tetracyclin, Streptomycin, Spectinomycin und Sulfamethoxazol ist.

- 10 Zur weiteren Charakterisierung der Antibiotikaresistenzen werden diese kloniert und sequenziert. Hierzu wird das Plasmid pTET3 aus Stamm LP-6 oder ATCC13032 [pTET3] isoliert, mit geeigneten Restriktionsenzymen behandelt, mit in gleicher Weise behandelten Kloniervektoren gemischt und
15 mit T4-DNA-Ligase behandelt. Das Ligationsgemisch wird durch Transformation in einen geeigneten Klonierwirt von *Escherichia coli* überführt. Die Selektion auf Transformanten erfolgt auf einem komplexen Nährboden, der mit dem jeweiligen Antibiotikum supplementiert wird.

- 20 Methodische Anleitungen hierzu findet der Fachmann beispielsweise in dem bekannten Handbuch von Sambrook et al.. Geeignete Kloniervektoren sind beispielsweise pUC19 (Yanish-Perron et al., *Gene* 33, 103-119 (1985)), pK18mob2 (Tauch et al., *Plasmid* 40, 126-139 (1998)) oder pCR2.1
25 (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande). Als Wirte eignen sich besonders solche *E. coli*-Stämme, die restriktions- und rekombinationsdefekt sind. Ein Beispiel hierfür ist der Stamm DH5 α MCR, der von Grant et al. (*Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 87, 4645-4649 (1990))
30 beschrieben wurde. Transformationsmethoden sind beispielsweise bei Hanahan (*Journal of Molecular Biology* 166, 577-580 (1983)) oder Tauch et al. (*Plasmid* 40, 126-139

(1998)) beschrieben. Zur Selektion auf Transformanten werden die Antibiotika verwendet, gegen die das Plasmid pTET3 Resistenz verleiht. Die Plasmid-DNA der erhaltenen Transformanten wird anschließend isoliert und die
5 klonierten DNA-Fragmente des Plasmids pTET3 werden sequenziert. Die Sequenzen werden anschließend wie oben beschrieben analysiert und mit in Datenbanken gesammelten DNA-Sequenzen verglichen.

Die Erfinder fanden auf diese Weise heraus, daß die Gene
10 die Resistenz gegen die Antibiotika Tetracyclin, Streptomycin, Spectinomycin und Sulfamethoxazol vermitteln, auf einem kontinuierlichen DNA-Fragment lokalisiert sind. Dieses DNA-Fragment ist als Restriktionskarte in Abbildung 5 dargestellt. Der DNA-Abschnitt, der die Gene tetR, tetA
15 und aadA enthält, ist als Sequenz in der SEQ ID No. 6 dargestellt und Bestandteil der Erfindung.

Weiterhin wurden die Aminosäuresequenzen des von dem jeweiligen Gen kodierten Proteins aus der ermittelten DNA-Sequenz abgeleitet. In SEQ ID No. 7 ist die abgeleitete
20 Aminosäuresequenz des vom tetA-Gen kodierten Tetracyclin-Resistenzproteins TetA und in SEQ ID No. 8 die abgeleitete Aminosäuresequenz des vom aadA-Gen kodierten Spectinomycin- / Streptomycin-Resistenzproteins AadA dargestellt. SEQ ID No. 9 zeigt die Kodierregion des tetR-Gens und SEQ ID No.
25 10 die Aminosäuresequenz des Tetracyclinresistenz-Repressorproteins TetR.

Kodierende DNA-Sequenzen, die sich aus SEQ ID No. 6 durch die Degeneriertheit des genetischen Codes ergeben, sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung. In gleicher Weise sind
30 DNA-Sequenzen, die mit SEQ ID No. 1 oder Teilen von SEQ ID No. 1 hybridisieren, Bestandteil der Erfindung. In der

Fachwelt sind weiterhin konservative Aminosäureaustausche wie z.B. der Austausch von Glycin gegen Alanin oder von Asparaginsäure gegen Glutaminsäure in Proteinen als „Sinnmutationen“ (sense mutations) bekannt, die zu keiner
5 grundsätzlichen Veränderung der Aktivität des Proteins führen, d. h. funktionsneutral sind. Aminosäuresequenzen, die sich in entsprechender Weise aus SEQ ID No. 7, 8 und 10 ergeben sind ebenfalls Bestandteil der Erfindung.

Die DNA-Fragmente der Plasmide pTET3 und pCRY4 aus
10 Corynebacterium glutamicum Stamm LP-6 können anschließend mit DNA-Fragmenten bekannter Plasmide anderer Mikroorganismen, wie z.B. Escherichia coli oder Corynebacterium glutamicum, zu weiteren, neuen Plasmidvektoren kombiniert werden. Im Rahmen der
15 vorliegenden Erfindung wird die Verwendung von Plasmid-DNA anderer Stämme der Spezies Corynebacterium glutamicum bevorzugt. Diese als Selbstklonierung bezeichnete Vorgehensweise hat den Vorteil, daß das Einbringen artfremder Nukleotidsequenzen in die Spezies
20 Corynebacterium glutamicum unterbleibt. Derartige, weiterentwickelte Plasmidvektoren können ausschließlich aus Bestandteilen des neuen Plasmids pTET3 bestehen, d.h. aus einer Replikationsregion und mindestens einer Antibiotikum-Resistenzregion, die als Selektionsmarker benutzt wird. Ein
25 Beispiel hierfür ist der in Abbildung 6 dargestellte Plasmidvektor pSELF3-1. Sie können aber auch aus Bestandteilen eines bekannten Plasmids und Bestandteilen von pTET3 oder pCRY4 zusammengesetzt werden. Ein Beispiel hierfür ist der in Abbildung 7 dargestellte Plasmidvektor
30 pSELF1-1, bei dem das bekannte kryptische Plasmid pGA1 (US-A 5,175,108) mit dem Tetracyclinresistenz-vermittelnden tetA-Gen von pTET3 versehen wurde.

Die ausgehend von den neuen Plasmiden pTET3 und pCRY4 konstruierten Plasmidvektoren lassen sich vorteilhaft für die fermentative Herstellung industriell interessanter Stoffwechselprodukte wie Aminosäuren, Vitamine und
5 Nukleotide einsetzen.

Beispielhaft wurde im Rahmen der vorliegenden Erfindung ein für eine „feed back“-resistente Aspartatkinase kodierendes lysC(FBR)-Allel von *C. glutamicum* mittels pSELF1-1 in *C. glutamicum* ATCC13032 kloniert. Auf diese Weise wurde ein
10 selbstklonierter Lysin-produzierender Stamm von *C. glutamicum* hergestellt.

Weiterhin wurde beispielhaft das für die L-Aspartat- α -Decarboxylase kodierende panD-Gen von *C. glutamicum* mittels pSELF1-1 in den *C. glutamicum* Stamm ATCC13032 Δ ilvA
15 kloniert. Auf diese Weise wurde ein selbstklonierter Pantothensäure-produzierender Stamm von *C. glutamicum* hergestellt.

Ein ganz besonderer Vorteil der neuen Plasmide pTET3 und pCRY4 und davon ausgehend hergestellter weiterer
20 Plasmidvektoren besteht darin, daß sie einen ungewöhnlich hohen Grad an Kompatibilität zu bekannten Plasmiden bzw. Plasmidvektoren aufweisen.

So wurde herausgefunden, daß Plasmid pTET3 in Gegenwart von Plasmidvektoren, die auf pGA1 (US-A 5,175,108), pAG3 (US-A
25 5,158,891), pBL1 (Santamaria et al., Journal of General Microbiology 130, 2237-2246 (1984)) oder auf pHM1519 (Miwa et al., Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)) beruhen, koexistieren kann bzw. mit diesen kompatibel ist. Diese Kompatibilität von pTET3 ist auch
30 dann gegeben, wenn die betreffende Wirtszelle bereits

mehrere der bekannten Plasmidvektoren beispielsweise einen pBL1-Abkömmling und gleichzeitig einen pHM1519-Abkömmling enthält. Die Fähigkeit von pTET3 mit bekannten Plasmiden bzw. Plasmidvektoren koexistieren zu können, ist über einen
5 ausreichend langen Zeitraum bzw. für eine ausreichend große Anzahl an Generationen gewährleistet.

Weiterhin wurde herausgefunden, daß Plasmid pCRY4 bei gleichzeitiger Anwesenheit der Plasmide pTET3, pGA1 (US-A 5,175,108) und pGA2 (US-A 5,175,108) in Gegenwart von
10 Plasmidvektoren, die auf pAG3 (US-A 5,158,891), pBL1 (Santamaria et al., Journal of General Microbiology 130, 2237-2246 (1984)) oder auf pHM1519 (Miwa et al., Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)) beruhen, koexistieren kann bzw. mit diesen kompatibel ist.
15 Diese Kompatibilität von pCRY4 ist auch dann gegeben, wenn die betreffende Wirtszelle bereits mehrere der bekannten Plasmidvektoren beispielsweise einen pBL1-Abkömmling und gleichzeitig einen pHM1519-Abkömmling enthält. Die Fähigkeit von pCRY4 mit bekannten Plasmiden bzw.
20 Plasmidvektoren koexistieren zu können, ist über einen ausreichend langen Zeitraum bzw. für eine ausreichend große Anzahl an Generationen gewährleistet.

Die hohe Kompatibilität der Plasmide pTET3 und pCRY4 kann in vorteilhafter Weise zur Verbesserung von Stämmen
25 eingesetzt werden, die Aminosäuren, Vitamine und Nukleotide produzieren. So beschreiben Sahm und Eggeling (Applied and Environmental Microbiology 65, 1973-1979 (1999)) beispielsweise den Pantothensäure-produzierenden Stamm ATCC13032 Δ ilvA [pECM3ilvBNCD, pEKEx2panBC]. Dieser Stamm
30 trägt das pHM1519-Derivat pECM3ilvBNCD und das pBL1-Derivat pEKEx2panBC. Der genannte Stamm, der bereits zwei Plasmide

enthält, konnte nach Transfer des panD-Gens mittels des Plasmidvektors pSELF3-1 in seinen Leistungseigenschaften deutlich verbessert werden.

Beispiele

Die vorliegende Erfindung wird im folgenden anhand von Ausführungsbeispielen näher erläutert.

Folgende Bakterienstämme wurden verwendet:

- 5 Corynebacterium glutamicum LP-6 wurde im Rahmen von EP-B 0 472 869 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) als DSM5816 hinterlegt. Die Aufbewahrungszeit von DSM5816 wurde gemäß Regel 9.1 des Budapester Vertrages verlängert. DSM5816 hat
- 10 die folgenden taxonomischen Merkmale:
- Zellform: Y-förmige Verzweigung
 - Peptidoglycan: meso-Diaminopimelinsäure
 - Mycolsäuren: Corynebacterium-Mycolsäuren mit hoher Ähnlichkeit zu DSM20300
- 15 - Fettsäuremuster: für Corynebacterium typisches Fettsäuremuster mit unverzweigten, gesättigten und ungesättigten Fettsäuren mit hoher Ähnlichkeit zu dem von DSM20300.
- G+C Gehalt: 55,1%
- 20 - 16S rDNA Sequenz: 98,6% Identität im Vergleich zu DSM20300
- DNA-DNA Homologie: 81,6% zu DSM20300

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 wurde von der American Type Culture Collection (Manassas, USA) bezogen.

- 25 Corynebacterium glutamicum ATCC13032 Δ ilvA ist als DSM12455 bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) hinterlegt.

Die in den nachstehenden Beispielen genannten allgemeinen genetischen Arbeitstechniken und verwendeten Nährmedien

sind in der Fachliteratur bei Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989)) beschrieben. Der Elektrotransfer von Plasmid-DNA erfolgte nach der Methode von Liebl et al.
5 (FEMS Microbiology Letters 65, 299-304 (1989)).

Die Sequenzierung der in den nachstehenden Beispielen beschriebenen DNA-Fragmente erfolgte nach der Dideoxy-Kettenabbruchmethode von Sanger et al. (Proceedings of the National Academy of Sciences USA 74, 5463-5467 (1977)). Die
10 erhaltenen Sequenz-Rohdaten wurden unter Benutzung des „STADEN Software-Paketes“ (Staden, Molecular Biotechnology 5, 233-241 (1996)) prozessiert. Die computergestützten Kodierbereichsanalysen wurde mit dem Programm „XNIP“ (Staden, Molecular Biotechnology 5, 233-241 (1996))
15 durchgeführt. Weitere Sequenzanalysen wurden mit den „BLAST-Programmen“ (Altschul et al., Nucleic Acids Research 25, 3389-3402 (1997)) durchgeführt.

Beispiel 1

Isolierung und Charakterisierung der neuen Plasmide pTET3
20 und pCRY4

Zur Identifizierung neuer Plasmide und zur Isolierung von Plasmid-DNA wurde der Bakterienstamm Corynebacterium glutamicum LP-6 in LB-Medium angezogen und nach der Anleitung des „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits
25 and Cartridges User Manual (PT3167-1)“ (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) isoliert. Die isolierte Plasmid-DNA wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und die Plasmidbanden, die den neuen Plasmiden pTET3 und pCRY4 entsprachen, jeweils getrennt aus
30 dem Agarosegel reisoliert. Die experimentelle

Arbeitsanleitung entsprach dem „QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Anschließend wurde die reisolierter Plasmid-DNA von pTET3 mit den Restriktionsenzymen AvrII, 5 MunI (New England Biolabs GmbH (Schwalbach, Deutschland), HpaI, ScaI, XbaI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und SpeI (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben jeweils einzeln und in Kombination verdaut. Die Restriktionsansätze 10 wurden anschließend in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch einen Vergleich der erhaltenen DNA-Fragmente mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde die in Abbildung 1 dargestellte 15 Restriktionskarte des Plasmids pTET3 aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 bestimmt.

Die reisolierter DNA des neuen Plasmids pCRY4 aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 wurde mit den Restriktionsenzymen AvrII (New England Biolabs GmbH 20 (Schwalbach, Deutschland), EcoRV, HpaI und ClaI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) nach den Herstellerangaben jeweils einzeln und in Kombination verdaut. Die Restriktionsansätze wurden anschließend in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Durch einen 25 Vergleich der erhaltenen DNA-Fragmente mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde die in Abbildung 2 dargestellte Restriktionskarte des Plasmids pCRY4 aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 bestimmt.

Beispiel 2

Isolierung und Sequenzierung der Replikationsregion von Plasmid pTET3

Zur Isolierung einer DNA-Region, die zur stabilen
5 Replikation der neuen Plasmide in coryneformen Bakterien
benötigt wird, wurde zunächst durch eine alkalische
Behandlung der Bakterienzellen Plasmid-DNA aus
Corynebacterium glutamicum LP-6 isoliert. Die
experimentelle Vorgehensweise ist detailliert in der
10 Anleitung des „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits
and Cartridges User Manual (PT3167-1)“ (Clontech
Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997)
beschrieben. Die erhaltene DNA-Präparation von
Corynebacterium glutamicum LP-6 wurde anschließend in einem
15 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf das Vorhandensein
von Plasmidbanden untersucht. Die identifizierten
Plasmidbanden von Corynebacterium glutamicum LP-6 wurden
den bekannten Plasmiden pGA1 und pGA2 (US-A- 5,175,108)
sowie den neuen Plasmiden pTET3 und pCRY4 zugeordnet. Die
20 Plasmidbande, die dem neuen Plasmid pTET3 entsprach, wurde
aus dem Agarosegel reisoliert (Siehe Beispiel 1). Die
experimentelle Arbeitsanleitung hierzu findet sich im
„QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“
(Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Anschließend
25 wurde die reisiolierte Plasmid-DNA mit den
Restriktionsenzymen AvrII (New England Biolabs GmbH
(Schwalbach, Deutschland) und HpaI (Pharmacia Biotech
Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verdaut und in den mit
den Restriktionsenzymen XbaI und SmaI (Pharmacia Biotech
30 Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gespaltenen Vektor
pK18mob2 (Tauch et al., Plasmid 40, 126-139 (1998))
kloniert. Die DNA-Restriktion und die DNA-Ligation mit dem

Enzym T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden entsprechend den Vorschriften der Hersteller durchgeführt. Dieses Ligationsgemisch wurde anschließend durch Elektroporation in den Stamm

5 Corynebacterium glutamicum ATCC13032 transferiert. Die Selektion wurde auf LB-Agar mit 25 µg/ml Kanamycin durchgeführt. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 30°C wurden Kolonien isoliert, die Plasmide enthielten. Die Anwesenheit von Plasmiden in den transformierten

10 Bakterienzellen wurde durch eine alkalische Lysemethode, die den Anleitungen im „QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997) folgte, nachgewiesen. Das isolierte Plasmid wurde pTET3-Rep genannt. Restriktionsanalysen von pTET3-Rep sowie ein

15 Vergleich der erhaltenen Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) ergaben, daß pTET3-Rep aus dem Kloniervektor pK18mob2 besteht, der ein ca. 4500 Basenpaare (bp) großes DNA-Fragment aus pTET3

20 enthält.

Für die doppelsträngige DNA-Sequenzierung des ca. 4500 bp großen DNA-Fragments aus pTET3-Rep wurde die DNA nach der Anleitung des „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“ (Clontech

25 Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) isoliert. Die Sequenzierung und die anschließende Kodierbereichsanalyse ergab die Identifizierung von zwei offenen Leserahmen (ORFs) auf dem sequenzierten DNA-Fragment. In Abbildung 3 ist eine Restriktionskarte des

30 sequenzierten DNA-Fragments von pTET3-Rep, die auch die Lage der beiden identifizierten ORFs zeigt, dargestellt. Analysen mit Hilfe der BLAST-Programme ergaben, daß ORF1

für ein als ParA bezeichnetes Stabilisierungsprotein kodiert, und daß ORF2 für ein als RepA bezeichnetes Replikationsprotein kodiert. ORF1 wurde entsprechend als parA-Gen und ORF2 als repA-Gen bezeichnet. Die DNA-Sequenz
5 des klonierten Fragmentes ist in SEQ ID No. 1 wiedergegeben. Die aus der DNA-Sequenz abgeleitete Aminosäuresequenz des Stabilisierungsproteins ParA ist in SEQ ID No. 2 dargestellt und die abgeleitete Aminosäuresequenz des Replikationsproteins RepA in SEQ ID
10 No. 3.

Beispiel 3

Bestimmung der Kopienzahl des pTET3-Replikons in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Zur Bestimmung der Kopienzahl des Plasmids pTET3-Rep wurde
15 der Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pTET3-Rep] für 20 Stunden bei 30°C in 100 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Anschließend wurde aus 25 ml Bakterienkultur die Gesamt-DNA des Stammes nach der Methode von Tauch et al. (Plasmid 34, 119-131 (1995)) isoliert. Die
20 gewonnene DNA wurde für 20 Minuten bei 37°C mit 20 µg/ml RNase/DNase-frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) behandelt und nach einer Phenolextraktion elektrophoretisch im 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Das mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel wurde unter UV-Licht
25 mit einem Cybertech CS1 Kamerasystem (Cybertech GmbH, Berlin, Deutschland) photographiert und das Negativ-Bild mit einem HP Scanjet 6100 C/T Optical Scanner (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) digitalisiert. Die Bandenintensität der DNA wurde mit dem Computersystem
30 WinCam der Firma Cybertech GmbH (Berlin, Deutschland) densitometrisch quantifiziert. Die Berechnung der

Kopienzahl erfolgte nach der Methode von Miwa et al. (Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)) unter der Annahme einer Chromosomengröße von 3082 kb (Bathe et al., Molecular and General Genetics 252, 255-265 (1996)) und ergab für das Plasmid pTET3-Rep in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 einen Wert von 15 Plasmiden pro Chromosom.

Beispiel 4

Isolierung und Sequenzierung der Replikationsregion von Plasmid pCRY4

Zur Isolierung des DNA-Bereichs, der zur stabilen Replikation des neuen Plasmids pCRY4 in coryneformen Bakterien benötigt wird, wurde durch eine alkalische Behandlung der Bakterienzellen Plasmid-DNA aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 isoliert. Die experimentelle Vorgehensweise ist der Anleitung des „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“ (Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) zu entnehmen. Die erhaltene DNA-Präparation von *Corynebacterium glutamicum* LP-6 wurde anschließend in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und auf das Vorhandensein einer pCRY4-Plasmidbande untersucht. Die identifizierte Plasmidbande, die dem neuen Plasmid pCRY4 entsprach, wurde danach aus dem Agarosegel reisoliert (Siehe Beispiel 1). Die experimentelle Arbeitsanleitung findet sich im „QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Anschließend wurde die reisiolierte Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym SphI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) verdaut und in den mit dem Restriktionsenzym SphI gespaltenen Vektor

pK18mob2 (Tauch et al., Plasmid 40, 126-139 (1998))
kloniert. Die DNA-Restriktion und die DNA-Ligation mit dem
Enzym T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,
Deutschland) wurden nach Herstellerangaben durchgeführt.

- 5 Das Ligationsgemisch wurde anschließend durch
Elektrotransfer in den coryneformen Bakterienstamm
Corynebacterium glutamicum ATCC13032 transferiert. Die
Selektion wurde auf LB-Agar mit 25 µg/ml Kanamycin
durchgeführt. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 30°C
10 wurden plasmidhaltige Kolonien isoliert. Das Vorhandensein
von Plasmiden in den transformierten Bakterienzellen wurde
durch eine alkalische Lysemethode, die den Anleitungen im
„QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“ (Qiagen
GmbH, Hilden, Deutschland, 1997) folgte, nachgewiesen. Das
15 isolierte Plasmid wurde pCRY4-Rep genannt.
Restriktionsanalysen von pCRY4-Rep sowie ein Vergleich der
erhaltenen Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter
Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics
GmbH, Mannheim, Deutschland) ergaben, daß pCRY4-Rep ein ca.
20 1900 bp großes DNA-Fragment enthält.

- Für die doppelsträngige DNA-Sequenzierung des ca. 1900 bp
großen DNA-Fragments aus pCRY4-Rep wurde die DNA nach der
Anleitung des „NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits
and Cartridges User Manual (PT3167-1)“ (Clontech
25 Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) isoliert.
Die Sequenzierung der DNA und eine computergestützte
Kodierbereichsanalyse ermöglichte die Identifizierung von
einem offenen Leserahmen (ORF1) auf dem sequenzierten DNA-
Fragment. In Abbildung 4 ist die Restriktionskarte des
30 sequenzierten DNA-Fragments von pCRY4-Rep, die auch die
Lage des identifizierten ORFs zeigt, dargestellt. Analysen
mit Hilfe der BLAST-Programme ergaben, daß ORF1 für ein

Replikationsprotein (RepA) kodiert, der als repA-Gen bezeichnet wurde. Die DNA-Sequenz des klonierten Fragments ist in SEQ ID No. 4 wiedergegeben, die abgeleitete Aminosäuresequenz des Replikationsproteins RepA ist in SEQ
5 ID No. 5 dargestellt.

Beispiel 5

Bestimmung der Kopienzahl des pCRY4-Replikons in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Zur Bestimmung der Kopienzahl des Plasmids pCRY4-Rep wurde
10 der Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pCRY4-Rep] für 20 Stunden bei 30°C in 100 ml LB-Medium mit 25 µg/ml Kanamycin angezogen. Anschließend wurde aus 25 ml Bakterienkultur die Gesamt-DNA des Stammes nach der Methode von Tauch et al. (Plasmid 34, 119-131 (1995)) isoliert. Die
15 gewonnene DNA wurde für 20 Minuten bei 37°C mit 20 µg/ml RNase/DNase-frei (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) behandelt und nach einer Phenolextraktion elektrophoretisch im 0.8%igen Agarosegel aufgetrennt. Das
20 mit Ethidiumbromid gefärbte Agarosegel wurde unter UV-Licht mit einem Cybertech CS1 Kamerasystem (Cybertech GmbH, Berlin, Deutschland) photographiert und das Negativ-Bild mit einem HP Scanjet 6100 C/T Optical Scanner (Hewlett-Packard Co., Palo Alto, CA, USA) digitalisiert. Die Bandenintensität der DNA wurde mit dem Computersystem
25 WinCam der Firma Cybertech GmbH (Berlin, Deutschland) densitometrisch quantifiziert. Die Berechnung der Kopienzahl erfolgte nach der Methode von Miwa et al. (Agricultural and Biological Chemistry 48, 2901-2903 (1984)) unter der Annahme einer Chromosomengröße von 3082
30 kb (Bathe et al., Molecular and General Genetics 252, 255-265 (1996)) und ergab für das Plasmid pCRY4-Rep in

Corynebacterium glutamicum ATCC13032 einen Wert von 3 Plasmiden pro Chromosom.

Beispiel 6

Isolierung und Sequenzierung der Antibiotikum-

5 Resistenzregion des Plasmids pTET3

Zur Identifizierung von Antibiotikum-Resistenzbereichen auf den neuen Plasmiden pTET3 oder pCRY4 wurden der resistente Teststamm Corynebacterium glutamicum LP-6 und der sensitive Kontrollstamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 zunächst

10 gemäß den experimentellen Vorschriften des „National Committee of Clinical Laboratory Standards“ (National Committee of Clinical Laboratory Standards, Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; Approved Standard, M7-A4 (1997)) in

15 Gegenwart und Abwesenheit verschiedener Antibiotika und Antibiotikum-Konzentrationen angezogen. Die für diesen Test benötigten Antibiotika, u.a. die Antibiotika Tetracyclin, Spectinomycin, Streptomycin und Sulfamethoxazol, wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen,

20 Deutschland) bezogen und in den in den „Approved Standards M7-A4“ angegebenen Konzentrationen eingesetzt. Das für diesen Test benötigte Nährmedium „MÜLLER-HINTON-Bouillon“ wurde von der Firma Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland) bezogen und entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt.

25 Den Vorschriften der „Approved Standards M7-A4“ folgend ließen sich Hemmkonzentrationen bestimmen (Tabelle 1) und Resistenzen des Bakterienstammes Corynebacterium glutamicum LP-6 gegen die Antibiotika Tetracyclin, Spectinomycin, Streptomycin und Sulfamethoxazol identifizieren.

30 Anschließend wurde die mit Hilfe einer alkalischen Lysemethode („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and

Cartridges User Manual (PT3167-1)", Clonetechn Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 isolierte Plasmid-DNA per Elektrottransfer nach *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 transferiert. Bei
5 der Primärselektion auf LB-Agar mit 5 µg/ml Tetracyclin wurde direkt auf das Vorhandensein der identifizierten Tetracyclin-Resistenz selektioniert. Das Vorhandensein eines Plasmids im transformierten Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 wurde anschließend
10 durch eine alkalische Lysemethode nachgewiesen („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)", Clonetechn Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997). Restriktionsanalysen der isolierten Plasmid-DNA sowie ein Vergleich der erhaltenen
15 Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und mit DNA-Fragmenten des Plasmids pTET3 ergaben, daß es sich bei dem transformierten, Tetracyclinresistenz-vermittelnden Plasmid um das Plasmid
20 pTET3 handelt. Der transformierte Stamm wurde *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pTET3] genannt.

Ein erneuter Resistenztest mit dem isolierten, resistenten Teststamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pTET3] und dem sensitiven Kontrollstamm *Corynebacterium glutamicum*
25 ATCC13032 gemäß den experimentellen Vorschriften des „National Committee of Clinical Laboratory Standards" in Gegenwart verschiedener Konzentrationen der Antibiotika Tetracyclin, Spectinomycin, Streptomycin und Sulfamethoxazol zeigte, daß der Teststamm *Corynebacterium*
30 *glutamicum* ATCC13032 [pTET3] Resistenzen gegen diese Antibiotika besitzt (Tabelle 1).

Tabelle 1

Minimale Inhibierungskonzentration (μg Antibiotikum pro ml)
verschiedenener *Corynebacterium glutamicum*-Stämme

Antibiotikum	ATCC13032	LP-6	ATCC13032 [pTET3]
Tetracyclin	$\leq 0,75$	≤ 12	≤ 12
Spectinomycin	≤ 50	> 2000	> 2000
Streptomycin	$\leq 0,5$	≤ 100	≤ 100
Sulfamethoxazol	≤ 150	≤ 300	≤ 300

5 Die Symbole haben folgende Bedeutung:

$>$: Die minimale Inhibierungskonzentration ist größer als der angegebene Wert.

\leq : Die minimale Inhibierungskonzentration ist kleiner oder gleich dem angegebenen Wert.

- 10 Zur weiteren Charakterisierung der Antibiotika-Resistenzen von pTET3 wurde die Plasmid-DNA mit Hilfe einer alkalischen Lysemethode („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) aus *Corynebacterium*
- 15 *glutamicum* ATCC13032 [pTET3] reisoliert. Die Plasmid-DNA wurde dann mit den Restriktionsenzymen HindIII bzw. SacI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gespalten und in die *Escherichia coli*-Kloniervektoren pK18mob2 (Tauch et al., Plasmid 40, 126-139 (1998)) bzw.
- 20 pUC19 (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) ligiert. Die DNA-Restriktion und die DNA-

Ligation mit dem Enzym T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurden entsprechend den Vorschriften der Hersteller durchgeführt. Der Ligationsansatz wurde anschließend per Elektroporation in

5 den Bakterienstamm *Escherichia coli* DH5 α MCR transferiert (Tauch et al., FEMS Microbiology Letters 123, 343-348 (1994)]. Nach Selektion auf LB-Agar mit 5 μ g/ml Tetracyclin bzw. 250 μ g/ml Spectinomycin wurden transformierte Kolonien erhalten, deren Plasmidvektoren DNA-Abschnitte aus dem

10 Plasmid pTET3 enthielten. Das Vorhandensein der Plasmidvektoren wurde durch eine alkalische Lysemethode nachgewiesen („QIAprep Miniprep Handbook for Purification of Plasmid DNA“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Restriktionsanalysen der isolierten Plasmid-DNA sowie ein

15 Vergleich der erhaltenen Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge ergaben, daß das pTET3-H9 genannte, isolierte Plasmid aus dem Plasmidvektor pK18mob2 und einem ca. 4000 bp großen DNA-Fragment aus pTET3 besteht, und daß das pXCS10 genannte, isolierte Plasmid aus dem

20 Plasmidvektor pUC19 (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und einem ca. 6750 bp großen DNA-Fragment aus pTET3 besteht. Der aus der Klonierung mit dem Restriktionsenzym HindIII hervorgegangene Plasmidvektor pTET3-H9 vermittelt in *Escherichia coli* DH5 α MCR Resistenz

25 gegen Tetracyclin (5 μ g/ml), der aus der Klonierung mit dem Restriktionsenzym SacI hervorgegangene Plasmidvektor pXCS10 verleiht Resistenzen gegen die Antibiotika Spectinomycin (250 μ g/ml), Streptomycin (250 μ g/ml) und Sulfamethoxazole (300 μ g/ml). Ein Vergleich der Restriktionsanalysen der

30 klonierten DNA-Fragmente von pTET3 in den Plasmidvektoren pTET3-H9 und pXCS10 zeigte außerdem, daß beide DNA-Fragmente um ca. 2400 bp überlappen und somit zu einem kontinuierlichen DNA-Strang von ca. 8350 bp Länge

zusammengesetzt werden können.

Für die doppelsträngige DNA-Sequenzierung eines kontinuierlichen, ca. 7300 bp großen und die Resistenzen gegen Tetracyclin, Spectinomycin und Streptomycin verleihenden DNA-Fragmentes von pTET3 wurde DNA der Plasmide pTET3-H9 und pXCS10 nach der Anleitung des „QIAprep Miniprep Handbook for Purification of Plasmid DNA“ (Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997) isoliert. Nach Sequenzierung und Analyse der Sequenz konnten vier offene Leserahmen (ORFs) auf dem sequenzierten DNA-Fragment bestimmt werden. In Abbildung 5 ist eine Restriktionskarte des sequenzierten DNA-Bereichs von pTET3 sowie die Lage der identifizierten offenen Leserahmen (ORFs) dargestellt. Die Analysen ergaben, daß ORF1 ein für ein Tetracyclinresistenz-Repressorprotein (TetR) kodierendes tetR-Gen, ORF2 ein für ein Tetracyclin-Resistenzprotein (TetA) kodierendes tetA-Gen, ORF3 ein für ein Spectinomycin-/Streptomycin-Resistenzprotein (AadA) kodierendes aadA-Gen und ORF4 ein für ein Sulfamethoxazol-Resistenzprotein (SulI) kodierendes sulI-Gen darstellt. Die DNA-Sequenz der Resistenzregion von pTET3 ist in SEQ ID No. 6 wiedergegeben. Die aus den Sequenzdaten abgeleitete Aminosäuresequenz des Tetracyclin-Resistenzproteins (TetA) ist in SEQ ID No. 7 dargestellt und die aus den Sequenzdaten abgeleitete Aminosäuresequenz des Spectinomycin-/Streptomycin-Resistenzproteins (AadA) in SEQ ID No. 8. Der Kodierbereich des für das Tetracyclinresistenz-Repressorprotein (TetR) kodierenden tetR-Gens ist außerdem in SEQ ID No. 9 dargestellt und die abgeleitete Aminosäuresequenz in SEQ ID No. 10.

Beispiel 7

Koexistenz des Plasmids pTET3 mit bekannten coryneformen Plasmiden in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032

Zur Analyse der Koexistenz des neuen Plasmids pTET3 aus
5 *Corynebacterium glutamicum* LP-6 mit bekannten coryneformen Plasmiden wurde der in Beispiel 6 erzeugte Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pTET3] verwendet.

Von diesem Stamm wurden elektrokompetente Zellen erzeugt, in die anschließend Plasmidvektoren, die aus bekannten
10 Plasmiden coryneformer Bakterien und Selektionsmarker-Anteilen bestehen, transferiert wurden. Für diesen DNA-Transfer wurden die Plasmidvektoren, pGA1-KE12, pAG3-Xba, pEBM2 [Tauch et al., Archives of Microbiology 169, 303-312 (1998)), pECM2 (Tauch et al., FEMS Microbiology Letters
15 123, 343-348 (1994)) und pECM3 ausgewählt. Beim Plasmid pGA1-KE12 handelt es sich um eine EcoRI-Fusion des kryptischen Plasmids pGA1 aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 mit dem Vektor pK18mob2 (Tauch et al., Plasmid 40, 126-139 (1998)). Das Plasmid pAG3-Xba ist eine XbaI-Fusion
20 von pAG3 und pK18mob2. Das Plasmid pECM3 stellt eine BamHI-BglII-Deletion von pECM2 dar. Der erfolgte Transfer der Kanamycinresistenz-vermittelnden Plasmidvektoren pGA1-KE12 (pGA1-Derivat), pAG3-Xba (pAG3-Derivat), pEBM2 (pBL1-Derivat) und pECM2 (pHM1519-Derivat) wurde auf LB-Agar mit
25 25 µg/ml Kanamycin selektioniert. Weiterhin wurde in den resultierenden Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 [pTET3, pEBM2], der die Plasmide pTET3 und pEBM2 trägt, das Chloramphenicolresistenz-vermittelnde Plasmid pECM3, ein pHM1519-Derivat, übertragen. Nach DNA-Transfer
30 wurde auf LB-Agar mit 7,5 µg/ml Chloramphenicol (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland)

selektioniert. Zur Bestätigung des erfolgten Plasmidtransfers wurde von den hergestellten Stämmen bzw. Transformanten Plasmid-DNA isoliert („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“, Clonetechn Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) und im 0,8%igen Agarosegel nachgewiesen.

Auf diese Weise wurden folgende Stämme von *Corynebacterium glutamicum* hergestellt:

- ATCC13032 [pTET3, pGA1-KE12]
- 10 • ATCC13032 [pTET3, pAG3-Xba]
- ATCC13032 [pTET3, pEBM2]
- ATCC13032 [pTET3, pECM2]
- ATCC13032 [pTET3, pEBM2, pECM3].

Zum weiteren Nachweis der Koexistenz des neuen Plasmids pTET3 mit bekannten Plasmidvektoren wurden die
15 hergestellten Stämme zunächst für 24 Stunden bei 30°C in LB-Medium angezogen, das mit den jeweiligen Antibiotika (5 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Chloramphenicol) supplementiert worden war. Jeweils 1 ml
20 der Kulturen wurde anschließend zweimal in antibiotikumfreiem LB-Medium gewaschen. Von den gewaschenen Bakteriensuspensionen wurden Verdünnungsreihen in LB-Medium angelegt und Suspensionen von 0,1 ml, die 10⁴ Zellen enthielten, auf jeweils 100 ml antibiotikumfreies und
25 antibiotikumhaltiges LB-Medium übertragen. Diese Kulturen wurden erneut bei 30°C über ca. 25 Generationen angezogen und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm mit einem Spectrophotometer

(Pharmacia LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verfolgt. Die Kulturen wurden dabei mindestens bis zu einer optischen Dichte von 8 (optische Dichte von 1 entspricht 4×10^8 Zellen pro ml) angezogen. Anschließend
5 wurde aus den Kulturen die Plasmid-DNA isoliert und im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die erhaltenen Plasmidbanden waren unter beiden Kulturbedingungen, d.h. in An- und Abwesenheit der Antibiotika, identisch und zeigten jeweils das Vorhandensein des Plasmids pTET3 und des
10 transformierten Plasmidvektors, d. h. pGA1-KE12, pAG3-Xba, pEBM2, pECM2, und pEBM2 plus pECM3 an.

Beispiel 8

Koexistenz des Plasmids pCRY4 mit anderen coryneformen Plasmiden in *Corynebacterium glutamicum* LP-6

15 Zur Analyse der Koexistenz des Plasmids pCRY4 mit bekannten coryneformen Plasmiden wurde *Corynebacterium glutamicum* LP-6 eingesetzt, in dem pCRY4 bereits mit den Plasmiden pGA1, pGA2 und pTET3 koexistiert.

In diesen Bakterienstamm wurden weitere Plasmidvektoren,
20 die aus bekannten, coryneformen Plasmiden und Selektionsmarker-Anteilen bestehen, transferiert. Für diesen DNA-Transfer wurden die Plasmidvektoren pAG3-Xba, pEBM2 (Tauch et al., Archives of Microbiology 169, 303-312 (1998)), pECM2 (Tauch et al., FEMS Microbiology Letters
25 123, 343-348 (1994)) und pECM3 eingesetzt. Das Plasmid pECM3 stellt eine BamHI-BglII-Deletion von pECM2 dar. Der Transfer der Kanamycinresistenz-vermittelnden Plasmidvektoren pAG3-Xba (pAG3-Derivat), pEBM2 (pBL1-Derivat), und pECM2 (pHM1519-Derivat) wurde auf LB-Agar mit
30 25 µg/ml Kanamycin selektioniert. Weiterhin wurde in den

resultierenden Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* LP-6 [pEBM2], der die Plasmide pGA1, pGA2, pTET3, pCRY4 und pEBM2 trägt, das Chloramphenicolresistenz-vermittelnde Plasmid pECM3, ein pHM1519-Derivat, übertragen. Nach DNA-
5 Transfer wurde auf LB-Agar mit 7,5 µg/ml Chloramphenicol selektioniert. Zur Bestätigung des erfolgreichen Plasmidtransfers wurde von den hergestellten Stämmen bzw. Transformanten Plasmid-DNA isoliert („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-
10 1)“, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) und die Plasmide durch Elektrophorese im 0,8%igen Agarosegel nachgewiesen.

Auf diese Weise wurden folgende Stämme von *Corynebacterium glutamicum* hergestellt:

- 15 • LP-6 [pAG3-Xba]
- LP-6 [pEBM2]
- LP-6 [pECM2]
- LP-6 [pEBM2, pECM3].

(Es sei daran erinnert, daß der Rezipientenstamm
20 *Corynebacterium glutamicum* LP-6 bereits die Plasmide pGA1, pGA2, pTET3 und pCRY4 enthält.)

Zum weiteren Nachweis der Koexistenz des Plasmids pCRY4 mit bekannten Plasmidvektoren wurden die hergestellten Stämme zunächst für 24 Stunden bei 30°C in LB-Medium angezogen,
25 das mit den jeweiligen Antibiotika (5 µg/ml Tetracyclin, 25 µg/ml Kanamycin und 10 µg/ml Chloramphenicol). Jeweils 1 ml der Bakterienkulturen wurde anschließend zweimal in antibiotikumfreiem LB-Medium gewaschen. Von den gewaschenen

Bakteriensuspensionen wurden Verdünnungsreihen in LB-Medium angelegt und Suspensionen von 0,1 ml, die 10^4 Zellen enthielten, auf jeweils 100 ml antibiotikumfreies und antibiotikumhaltiges LB-Medium übertragen. Diese Kulturen wurden erneut bei 30°C über ca. 25 Generationen angezogen und das Wachstum durch Messung der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 580 nm mit einem Spectrophotometer (Pharmacia LKB Novaspec II, Pharmacia, Freiburg, Deutschland) verfolgt. Die Kulturen wurden dabei mindestens bis zu einer optischen Dichte von 8 (optische Dichte von 1 entspricht 4×10^8 Zellen pro ml) angezogen. Anschließend wurde aus den Kulturen die Plasmid-DNA isoliert und im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die erhaltenen Plasmidbanden waren unter selektiven und nicht-selektiven Kulturbedingungen, d. h. in An- und Abwesenheit der Antibiotika identisch und zeigten jeweils das Vorhandensein der Plasmide pGA1, pGA2, pTET3 und pCRY4 sowie des transformierten Plasmidvektors, d.h. pAG3-Xba, pEBM2, pECM2 und pEBM2 plus pECM3 an.

20 Beispiel 9

Konstruktion des Plasmidvektors pSELF3-1 aus pTET3

Zur Konstruktion eines Plasmidvektors, der ausschließliche aus Komponenten des neuen Plasmids pTET3 besteht, wurde zunächst durch eine alkalische Behandlung der Bakterienzellen („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) Gesamt-Plasmid-DNA aus *Corynebacterium glutamicum* LP-6 isoliert. Die erhaltene DNA-Präparation wurde anschließend in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmidbande, die dem neuen Plasmid pTET3 entsprach, wurde aus dem Agarosegel

reisoliert („QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Danach wurde die reisolierte Plasmid-DNA mit dem Restriktionsenzym XhoI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) 5 nach den Herstellerangaben verdaut. Der Restriktionsansatz wurde im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und es wurde ein ca. 2500 bp großes DNA-Fragment, auf dem nach den DNA-Sequenzdaten (Beispiel 6) die Tetracyclin-Resistenzregion lokalisiert ist, reisoliert. Anschließend wurde die 10 isolierte pTET3-DNA mit den Restriktionsenzymen AvrII (New England Biolabs GmbH (Schwalbach, Deutschland) und HpaI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gespalten. Der Spaltungansatz wurde ebenfalls in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt, und es wurde das ca. 4500 15 bp große DNA-Fragment, auf dem nach den DNA-Sequenzinformationen die Replikationsregion von pTET3 lokalisiert ist, reisoliert. Die überstehenden DNA-Enden von beiden reisolierten DNA-Fragmenten wurden danach mit dem Enzym Klenow-Polymerase aufgefüllt. Die Auffüllreaktion 20 mit dem Enzym Klenow-Polymerase wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland). Die aufgefüllten DNA-Fragmente wurden dann durch das Enzym T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach 25 Herstellerangaben miteinander ligiert. Das Ligationsgemisch wurde durch Elektroporation in *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 transferiert. Die Selektion wurde auf LB-Agar mit 5 µg/ml Tetracyclin durchgeführt. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 30°C wurden Kolonien isoliert, die den neuen 30 Plasmidvektor enthalten. Die Anwesenheit des Plasmidvektors in den transformierten Bakterienzellen wurde durch eine alkalische Lysemethode („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997)

nachgewiesen. Das isolierte Plasmid wurde pSELF3-1 genannt. Restriktionsanalysen von pSELF3-1 sowie ein Vergleich der erhaltenen Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge ergaben die Restriktionskarte, die als Abbildung 6
5 beigefügt ist.

Plasmid pSELF3-1 besteht durch dieses Konstruktionsschema ausschließlich aus DNA-Fragmenten des neuen Plasmids pTET3 und damit aus DNA, die ausschließlich aus *Corynebacterium glutamicum* stammt.

10 Beispiel 10

Konstruktion des Plasmidvektors pSELF1-1

Aus dem bekannten Plasmid pGA1 (US-A 5,175,108) wurde unter Verwendung des Tetracyclinresistenzgens aus pTET3 (Siehe Beispiel 1 und 6) der Plasmidvektor pSELF1-1 hergestellt.

15 Hierzu wurde zunächst durch eine alkalische Behandlung der Bakterienzellen („NucleoBond Nucleic Acid Purification Kits and Cartridges User Manual (PT3167-1)“, Clontech Laboratories GmbH, Heidelberg, Deutschland, 1997) Gesamt-Plasmid-DNA von *Corynebacterium glutamicum* LP-6 isoliert.

20 Die erhaltene DNA-Präparation wurde in einem 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt. Die Plasmidbanden, die dem bekannten Plasmid pGA1 und dem neuen Plasmid pTET3 entsprachen, wurden aus dem Agarosegel isoliert („QIAEX II Handbook for DNA Extraction from Agarose Gels“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland). Danach wurde die isolierte
25 Plasmid-DNA von pGA1 mit dem Restriktionsenzym SalI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) nach den Herstellerangaben gespalten. Die isolierte Plasmid-DNA von pTET3 wurde mit dem Restriktionsenzym XhoI (Pharmacia
30 Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) gespalten. Der

Restriktionsansatz von pTET3 wurde im 0,8%igen Agarosegel aufgetrennt und es wurde ein ca. 2500 bp großes DNA-Fragment, auf dem nach den DNA-Sequenzdaten (Beispiel 6) die Tetracyclin-Resistenzregion lokalisiert ist,

5 reisoliert. Das erzeugte DNA-Fragment von pGAl und das reisolierete DNA-Fragment von pTET3 wurden dann mittels T4 DNA-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) nach den Angaben des Herstellers miteinander ligiert. Das Ligationsgemisch wurde durch Elektroporation in
10 *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 transferiert. Die Selektion wurde auf LB-Agar mit 5 µg/ml Tetracyclin durchgeführt. Nach Inkubation für 48 Stunden bei 30°C wurden Kolonien isoliert, die den neuen Plasmidvektor enthielten. Die Anwesenheit des Plasmidvektors in den
15 transformierten Bakterienzellen wurde durch eine alkalische Lysemethode („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997) nachgewiesen. Das isolierte Plasmid wurde pSELF1-1 genannt. Restriktionsanalysen von pSELF1-1 sowie ein Vergleich der
20 erhaltenen Fragmentlängen mit DNA-Fragmenten bekannter Länge ergaben die Restriktionskarte, die als Abbildung 7 beigefügt ist.

Plasmid pSELF1-1 besteht durch diesen Konstruktionsweg ausschließlich aus DNA-Fragmenten, die aus *Corynebacterium*
25 *glutamicum* stammen.

Beispiel 11

Produktion von Lysin unter Verwendung von pSELF1-1

Um die Kopienzahl eines Gens, das an der Biosynthese der Aminosäure Lysin in coryneformen Bakterien beteiligt ist,
30 zu erhöhen, wurde das *lysC*(FBR)-Gen aus *Corynebacterium*

glutamicum ausgewählt. Das lysC(FBR)-Gen kodiert eine gegen das Antimetabolit S-(2-Aminoethyl)-Cystein resistente Form des Enzyms Aspartatkinase und lag auf dem Plasmidvektor pJC30 kloniert vor (Cremer et al., Applied and
5 Environmental Microbiology 57, 1746-1752 (1991)).

Zur Klonierung des lysC(FBR)-Gens in den in Beispiel 10 beschriebenen Plasmidvektor pSELF1-1, wurde Plasmid-DNA von pSELF1-1 und von pJC30 mit den Restriktionsenzymen EcoRI und ScaI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg,
10 Deutschland) nach Herstellerangaben gespalten. Anschließend wurden die Restriktionsansätze mit dem Enzym T4 DNA-Ligase miteinander ligiert (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und in den Bakterienstamm Corynebacterium glutamicum ATCC13032 transformiert. Die Selektion wurde auf
15 LB-Agar mit 5 µg/ml Tetracyclin durchgeführt. Durch eine alkalische Lysemethode („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997) wurde aus transformierten Kolonien Plasmid-DNA reisoliert. Durch Restriktionsanalysen dieser Plasmid-DNA und durch
20 Vergleiche mit DNA-Fragmenten bekannter Länge wurde das Plasmid pSELF1-lysC isoliert, das aus dem Plasmidvektor pSELF1-1 und dem lysC(FBR)-Genbereich besteht.

Die Plasmide pSELF1-lysC und der Kontrollvektor pSELF1-1 wurden per Elektroporation in den Stamm Corynebacterium
25 glutamicum ATCC13032 transferiert. Der Plasmidtransfer wurde anschließend mittels alkalischer Lyse und Gelelektrophorese nachgewiesen („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Die auf diese Weise konstruierten
30 Stämme ATCC13032 [pSELF1-1] und ATCC13032 [pSELF1-lysC] wurden zur Produktion von Lysin eingesetzt.

Die beiden Stämme wurden zunächst für 24 Stunden bei 30°C in 50 ml Luria-Bertani Medium mit 5 µg/ml Tetracyclin angezogen. Anschließend wurde jeweils 1 ml Kultur zweimal in Mineralmedium (Bröer et al., Applied and Environmental Microbiology 59, 316-321 (1993)) gewaschen, in 100 ml Mineralmedium mit 5 µg/ml Tetracyclin übertragen und erneut für 24 Stunden bei 30°C inkubiert. Je 5 ml Kulturüberstand wurden für 15 Minuten bei 13800xg und 4°C pelletiert und mit einer Millex-GS Filtereinheit (0,22 µm, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) sterilfiltriert. Die Bestimmung von Lysin in den filtrierten Kulturüberständen erfolgte mittels HPLC-Analytik nach der Methode von Büntemeyer et al. (Cytotechnology 5, 57-67 (1991)). Die erhaltenen Lysin-Konzentrationen nach 24 Stunden Kultur sind in Tabelle 2 zusammengefaßt.

Tabelle 2

Lysin-Konzentration in Kulturüberständen von verschiedenen Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*

Wirt	Plasmid	Lysin-Konzentration (g / l)
ATCC13032	pSELF1-1	0,02
ATCC13032	pSELF1-lysC	1,0

20 Beispiel 12

Produktion von Pantothensäure unter Verwendung von pSELF3-1

Zur Erhöhung der Kopienzahl eines Gens, das an der Biosynthese von Pantothenat in coryneformen Bakterien

beteiligt ist, wurde das panD-Gen aus *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 ausgewählt. Das panD-Gen kodiert für das Enzym L-Aspartat- α -Decarboxylase und lag auf dem Plasmidvektor pND10 kloniert vor (Dusch et al., Applied and Environmental Microbiology 65, 1530-1539 (1999)).

Zur Klonierung des panD-Gens in den neuen, in Beispiel 9 beschriebenen Plasmidvektor pSELF3-1, wurde Plasmid-DNA von pSELF3-1 mit den Restriktionsenzymen SacI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) und BstZ17I (New England Biolabs GmbH, Schwalbach, Deutschland) und Plasmid-DNA von pND10 mit den Restriktionsenzymen SacI und ScaI (Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg, Deutschland) entsprechend den Herstellerangaben gespalten. Anschließend wurden die Restriktionsansätze mit dem Enzym T4 DNA-Ligase nach Herstellerangaben miteinander ligiert (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) und in den Bakterienstamm *Corynebacterium glutamicum* ATCC13032 transformiert. Die Selektion wurde auf LB-Agar mit 5 μ g/ml Tetracyclin durchgeführt. Aus den transformierten Kolonien wurde durch alkalische Lyse Plasmid-DNA reisoliert („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Nach Restriktionsanalysen der isolierten Plasmid-DNA und durch einen Vergleich mit DNA-Fragmenten bekannter Länge (DNA Molecular Weight Marker X, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland) wurde das Plasmid pSELF3-panD isoliert, das aus dem Plasmidvektor pSELF3-1 und dem für das panD-Gen kodierenden Bereich von pND10 besteht.

Zur Analyse der Pantothanat-Produktion in coryneformen Bakterien wurden der konstruierte Plasmidvektor pSELF3-panD und der Kontrollvektor pSELF3-1 in den Stamm ATCC13032 Δ ilvA

(Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology 65, 1973-1979 (1999)) transferiert. Das Vorhandensein der Plasmide wurde danach mittels alkalischer Lyse nachgewiesen („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, 5 Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Die auf diese Weise konstruierten Stämme ATCC13032 Δ ilvA [pSELF3-1] und ATCC13032 Δ ilvA [pSELF3-panD] wurden zur Produktion von Pantothenat eingesetzt.

Die Bakterienstämme wurden zunächst für 24 Stunden bei 30°C 10 in 50 ml Luria-Bertani Medium mit 5 µg/ml Tetracyclin angezogen. Anschließend wurde 1 ml der Bakterienkultur zweimal mit CGXII-Medium (Keilhauer et al., Journal of Bacteriology 175, 5595-5603, (1993)), dem 2 mM Isoleucin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) 15 zugesetzt wurden, gewaschen, in 50 ml CGXII-Medium mit 2 mM Isoleucin und 5 µg/ml Tetracyclin übertragen und für 24 Stunden bei 30°C angezogen. Mit 3 ml dieser Kultur wurden erneut 50 ml CGXII-Medium, das 2 mM Isoleucin enthielt, inokuliert. Nach weiterer Inkubation des Ansatzes für 24 20 Stunden bei 30°C wurden 20 ml der Bakterienkultur für 10 Minuten mit 1250×g pelletiert. Der Kulturüberstand wurde anschließend mit einer Millex-GS Filtereinheit (0,22 µm, Millipore S.A., Molsheim, Frankreich) sterilfiltriert. Die Bestimmung der Pantothenat-Konzentration in den filtrierten 25 Kulturüberständen wurde nach der Anleitung des Difco-Manual, 10th Edition (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, USA) durchgeführt. Die erhaltenen Pantothenat-Konzentrationen nach 24 Stunden Kultur sind in Tabelle 3 zusammengefaßt.

Tabelle 3

Pantothenat-Konzentration in Kulturüberständen von verschiedenen Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*

Wirt	Plasmid	Pantothenat-Konzentration (ng / ml)
ATCC13032 Δ ilvA	pSELF3-1	14,1
ATCC13032 Δ ilvA	pSELF3-panD	54,1

- 5 Weiterhin wurde der konstruierte Plasmidvektor pSELF3-panD eingesetzt, um den Stamm ATCC13032 Δ ilvA [pEKEx2panBC, pECM3ilvBNCD] (Sahm et al., Applied and Environmental Microbiology 65, 1973-1979 (1999)) weiter zu verbessern. Dieser Stamm trägt auf bekannten Plasmidvektoren bereits
10 die Gene ilvBNCD und panBC, die sich vorteilhaft auf die Biosynthese von Pantothenat auswirken.

Der Plasmidvektor pSELF3-panD und der Kontrollvektor pSELF3-1 wurden durch Elektroporation in den Stamm ATCC13032 Δ ilvA [pEKEx2panBC, pECM3ilvBNCD] (Sahm et al.,
15 Applied and Environmental Microbiology 65, 1973-1979 (1999)) transferiert. Die Selektion erfolgte auf LB-Agar mit 5 μ g/ml Tetracyclin. Das Vorhandensein der transferierten Plasmidvektoren und der bereits im Bakterienstamm vorliegenden Plasmide wurde danach mittels
20 alkalischer Lyse nachgewiesen („QIAGEN Plasmid Mini Handbook for Plasmid Mini Kit“, Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland, 1997). Beide auf diese Weise konstruierten Stämme wurden ebenfalls in der oben beschriebenen Weise zur Produktion von Pantothenat eingesetzt. Die erhaltenen

Pantothenat-Konzentrationen in den Kulturüberständen nach 24 Stunden Kultur sind in Tabelle 4 dargestellt.

Tabelle 4

5 Pantothenat-Konzentration in Kulturüberständen von verschiedenen Stämmen von *Corynebacterium glutamicum*

Wirt	Plasmide	Pantothenat-Konzentration (ng / ml)
ATCC13032 Δ ilvA	pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC pSELF3-1	18,3
ATCC13032 Δ ilvA	pECM3ilvBNCD pEKEx2panBC pSELF3-panD	655,2

Folgende Abbildungen sind beigelegt:

- Abbildung 1: Restriktionskarte des Plasmids pTET3.
- Abbildung 2: Restriktionskarte des Plasmids pCRY4.
- Abbildung 3: Karte der Replikationsregion des Plasmids pTET3.
- Abbildung 4: Karte der Replikationsregion des Plasmids pCRY4
- Abbildung 5: Karte der Antibiotikaresistenzregion des Plasmids pTET3.
- Abbildung 6: Karte des Plasmidvektors pSELF3-1.
- Abbildung 7: Karte des Plasmidvektors pSELF1-1.

Längenangaben sind als ca.-Angaben aufzufassen. Die verwendeten Abkürzungen und Bezeichnungen haben folgende Bedeutung:

- bps: Basenpaare
- AvrII: Schnittstelle für das Restriktionsenzym AvrII
- ClaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym ClaI
- EcoRI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRI
- EcoRV: Schnittstelle für das Restriktionsenzym EcoRV
- FspI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym FspI
- HindIII: Schnittstelle für das Restriktionsenzym HindIII
- HpaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym HpaI

MunI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym MunI

NruI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym NruI

PstI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym PstI

SacI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SacI

5 SacII: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SacII

SalI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SalI

ScaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym ScaI

SmaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SmaI

SpeI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SpeI

10 SphI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym SphI

XbaI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym XbaI

XhoI: Schnittstelle für das Restriktionsenzym XhoI

aadA: Gen für das Spectinomycin-Streptomycin-Resistenzprotein

15 parA: Gen für das Stabilisierungsprotein ParA

sulI: Gen für das Sulfamethoxazol-Resistenzprotein

repA: Gen für das Replikationsprotein RepA

tetA: Gen für das Tetracyclin-Resistenzprotein

tetR: Gen für das Tetracyclin-Repressorprotein

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Degussa-Hüls AG

5 <120> Neue Plasmide aus Corynebacterium glutamicum und deren Verwendung

<130> 990111 BT

10 <140>
<141>

<160> 10

15 <170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 4539

<212> DNA

20 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

<220>

<221> CDS

<222> (228) .. (824)

25 <223> parA

<220>

<221> CDS

<222> (1829) .. (3295)

30 <223> repA

<400> 1

cctaggctta gatgtgctgt cataattttc gccctcccg tcagacattt ggacatggat 60

35 ctcgggaaag attaagcggg ggaacttgaa ataattccac tttaaactag gaaatagcag 120

gtcaaagcga tatgttaagg cgctataaca tgagtatgtt atagcgctaa aacacacaac 180

40 atacttatgt tatgcagcta agacggaagt atgtcagact gataatc atg tcc ata 236
Met Ser Ile
145 ctg act atc gct cac aca aaa ggc ggc gtg gga aaa acg acc tct gca 284
Leu Thr Ile Ala His Thr Lys Gly Gly Val Gly Lys Thr Thr Ser Ala
5 10 15gtg ctt ttg tgt gca gct gcc cac gcc cgc gga cta gcc gtt acc ctc 332
Val Leu Leu Cys Ala Ala Ala His Ala Arg Gly Leu Ala Val Thr Leu
20 25 30 3550 att gac tcc gac gct cag ggc acc gcc acc gcc tgg gcc cac gct gcc 380
Ile Asp Ser Asp Ala Gln Gly Thr Ala Thr Ala Trp Ala His Ala Ala
40 45 5055 gaa gaa gcc ggt gat act ttc ccg tgg cct atc atc aca gcg gcc acg 428
Glu Glu Ala Gly Asp Thr Phe Pro Trp Pro Ile Ile Thr Ala Ala Thr
55 60 65

cct gcc cac ctt gcc cga acg ctc gac ggc cat aac gga ctc gtc atc 476
 Pro Ala His Leu Ala Arg Thr Leu Asp Gly His Asn Gly Leu Val Ile
 70 75 80

5 gtt gat acc ccg ccc ggt ggc tac gaa gtg atc gag acc gcc atc gaa 524
 Val Asp Thr Pro Pro Gly Gly Tyr Glu Val Ile Glu Thr Ala Ile Glu
 85 90 95

10 gca ggc gac ctc atc ctg atc ccc acc tct gcc tcc ccg cta gac atc 572
 Ala Gly Asp Leu Ile Leu Ile Pro Thr Ser Ala Ser Pro Leu Asp Ile
 100 105 110 115

15 aat cga gtc tgg cca act gtt gag gcc acc agt cac aag ccc gcc gta 620
 Asn Arg Val Trp Pro Thr Val Glu Ala Thr Ser His Lys Pro Ala Val
 120 125 130

20 gtc tgt cta tcc cag atc gac tcc cgc acc acc ttg ccc aag att gcc 668
 Val Cys Leu Ser Gln Ile Asp Ser Arg Thr Thr Leu Pro Lys Ile Ala
 135 140 145

cgt acc gca ctt gaa aac gaa ggc gtc gtc gtc gct gaa acg gag atc 716
 Arg Thr Ala Leu Glu Asn Glu Gly Val Val Val Ala Glu Thr Glu Ile
 150 155 160

25 ccc gcc cga gaa gcg tta aga cat atg tat gct aca act cca caa cgt 764
 Pro Ala Arg Glu Ala Leu Arg His Met Tyr Ala Thr Thr Pro Gln Arg
 165 170 175

30 tta tat ggc tac gat gaa cta ctt act gaa cta ctg tcc tca aac ctg 812
 Leu Tyr Gly Tyr Asp Glu Leu Leu Thr Glu Leu Leu Ser Ser Asn Leu
 180 185 190 195

35 ttg gga gaa cat taatggctga tttatccaag aagctggcga aagcgcccgt 864
 Leu Gly Glu His

taccagcgcg ccgcaaaaga aagtggcga gacctttact accgccacgg agaagcccac 924

40 ccgcaccacc atttaccttc caacaagtct cgctaagcgc cttaagcatg ctgccgtcga 984

agaggagcgc agtgtctctg caatcctcgc aggactggcc gaagactggc taaacaaaga 1044

agacgactaa gtatgtttat atgtcatggc atacgacata caaacataac aacatagaaa 1104

45 cctaacaacg tattaactcc aagtagtcag cgctggagac catgccccat cgacacgcgg 1164

ctgcgctgct cgtggggcca gaagtggcgc aggactgatg aaagaaaccc acaagacgtt 1224

taagcgtcaa agcgtcaagc ggacacaaca tgaaaacatc aagacgttta gacccttgcg 1284

50 gcctttgacg ccagtcgccg cgaaacttat acattcgacg caatctatga agagatttaa 1344

ggaatgaagg agacggcttt aatgtcacca gcacggcgca gttcaagaac cactaccgga 1404

55 cgaaaaacaa cacgcccctc ggcggaaca cccacaccga ccgacgagga aggcacagag 1464

cttaccggc gtacaacat ttacctcaaa gaggaacat ggaaatccat gaagcgcatg 1524

accgtagaaa caggagaaag cgtttctgcg tacatcgaac gactcattga taaagatgta 1584

aagcgcgtcc agaaaaagtt actccaaaac cccaaatcgc tataacacga aaacataaca 1644
acgttatagc gcttttagcac taaactgtat cggggcaggt taaaaacttt tcgtgtcgca 1704
5 ggcacagagc aatcacactc gtgttactct ggtcgaaaac cttataaatg catgaagtcc 1764
gccaggttg caccctgac ggacttcgct atcacccgga ggacacccgg gggaaagcac 1824
10 gtca atg agc tta cct tca aaa gga cga tca agc aca cct aca ggt gtg 1873
Met Ser Leu Pro Ser Lys Gly Arg Ser Ser Thr Pro Thr Gly Val
200 205 210
cgt gtt gcc caa cca ctg ccc acc cac cgc gac act ggc ggc ctg gac 1921
15 Arg Val Ala Gln Pro Leu Pro Thr His Arg Asp Thr Gly Gly Leu Asp
215 220 225 230
gac acc ccg gca gga ttc act gat cgt gat gca ctt ata gat cat ctc 1969
20 Asp Thr Pro Ala Gly Phe Thr Asp Arg Asp Ala Leu Ile Asp His Leu
235 240 245
ggg cgt aaa gca atc cac gga agc aaa gac cgt gac ttc ggc aaa gct 2017
25 Gly Arg Lys Ala Ile His Gly Ser Lys Asp Arg Asp Phe Gly Lys Ala
250 255 260
tat tac cgc cac gag gac ggt act ctt cgc ccg cgc ttg tat cgc gtg 2065
Tyr Tyr Arg His Glu Asp Gly Thr Leu Arg Pro Arg Leu Tyr Arg Val
265 270 275
gat tct gag gcg ttg aca cgc tgc cag tac gtc atg ctc acc acg cag 2113
30 Asp Ser Glu Ala Leu Thr Arg Cys Gln Tyr Val Met Leu Thr Thr Gln
280 285 290
caa tac gcc gct gta tta gtg gtc gat att gac cag ccc ggc caa tcg 2161
35 Gln Tyr Ala Ala Val Leu Val Val Asp Ile Asp Gln Pro Gly Gln Ser
295 300 305 310
gga ggg cac cca gcg aac tta tcg cct gag gtt cgt cag aag atg gcc 2209
40 Gly Gly His Pro Ala Asn Leu Ser Pro Glu Val Arg Gln Lys Met Ala
315 320 325
gct ctt atc gag cac aac ctt ggg ccg tcg tgg gtg ggc att aat ccc 2257
45 Ala Leu Ile Glu His Asn Leu Gly Pro Ser Trp Val Gly Ile Asn Pro
330 335 340
caa aac ggt aaa gca cag gcg atc tgg ttg att gat ccg gtg tac gca 2305
Gln Asn Gly Lys Ala Gln Ala Ile Trp Leu Ile Asp Pro Val Tyr Ala
345 350 355
gac aaa agc ggc aaa tct cgg cat atg agt ctg ctt gcc gcg acg agc 2353
50 Asp Lys Ser Gly Lys Ser Arg His Met Ser Leu Leu Ala Ala Thr Ser
360 365 370
cgt gct ttg ggt gag ctg ttg gat cat gat ccg aat ttc tct cac cgt 2401
55 Arg Ala Leu Gly Glu Leu Leu Asp His Asp Pro Asn Phe Ser His Arg
375 380 385 390

	ttt agt cgg agc ccg ttt tat gac ggc aac gac cct acc gcc tat cgt	2449
	Phe Ser Arg Ser Pro Phe Tyr Asp Gly Asn Asp Pro Thr Ala Tyr Arg	
	395 400 405	
5	tgg tat tgc cag cac aaa cac gtg cgc cgg tta gct gat ctt ctt aag	2497
	Trp Tyr Cys Gln His Lys His Val Arg Arg Leu Ala Asp Leu Leu Lys	
	410 415 420	
10	gag ata cgc act atg acg ggt caa gag cag tac acc aag cct cag caa	2545
	Glu Ile Arg Thr Met Thr Gly Gln Glu Gln Tyr Thr Lys Pro Gln Gln	
	425 430 435	
15	cag ttt tct agt ggc cgc gag ctt att aat gct gtg aaa act cgc aga	2593
	Gln Phe Ser Ser Gly Arg Glu Leu Ile Asn Ala Val Lys Thr Arg Arg	
	440 445 450	
20	gaa gaa gcc caa gca ttt aaa gca ctt gcc cag gac gtc gag acc gaa	2641
	Glu Glu Ala Gln Ala Phe Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Glu Thr Glu	
	455 460 465 470	
	ctc agc aca gag ctt gat cag tac gac ccg gaa ctt atc gaa ggg gta	2689
	Leu Ser Thr Glu Leu Asp Gln Tyr Asp Pro Glu Leu Ile Glu Gly Val	
	475 480 485	
25	cga gtc tta tgg att agc cag ggg cgt gct gcc cgg gat gag acg gcg	2737
	Arg Val Leu Trp Ile Ser Gln Gly Arg Ala Ala Arg Asp Glu Thr Ala	
	490 495 500	
30	ttt cgt tac gct ttg aaa acc tgc cac cgg cta cgg gcc gca ggt gag	2785
	Phe Arg Tyr Ala Leu Lys Thr Cys His Arg Leu Arg Ala Ala Gly Glu	
	505 510 515	
35	cgt atg act gat gcc gcg atc att gat gcc tat gag cat gcg tat aac	2833
	Arg Met Thr Asp Ala Ala Ile Ile Asp Ala Tyr Glu His Ala Tyr Asn	
	520 525 530	
40	gtt gct cag cgc cat ggg gga gac ggc cgg gat agt gag atg ccg ccg	2881
	Val Ala Gln Arg His Gly Gly Asp Gly Arg Asp Ser Glu Met Pro Pro	
	535 540 545 550	
	atg cgg gat cgc cag acg atg gcg cgt cgc gtg cgc ggc tac gtg act	2929
	Met Arg Asp Arg Gln Thr Met Ala Arg Arg Val Arg Gly Tyr Val Thr	
	555 560 565	
45	caa tct aag acc agt atg ggc gca tca gcc cct cca ggg cgt gct aca	2977
	Gln Ser Lys Thr Ser Met Gly Ala Ser Ala Pro Pro Gly Arg Ala Thr	
	570 575 580	
50	agc act gaa cgt aaa gca tta tcc acg atg ggg cgt cga ggc ggt aaa	3025
	Ser Thr Glu Arg Lys Ala Leu Ser Thr Met Gly Arg Arg Gly Gly Lys	
	585 590 595	
55	aag gcc gca gaa cgc tgg aaa gac cgt gag agc cat tac gcg caa act	3073
	Lys Ala Ala Glu Arg Trp Lys Asp Arg Glu Ser His Tyr Ala Gln Thr	
	600 605 610	

5 gaa ttg gaa aag ctt gcc gat gcc agt aag aag cgt tca aga aaa gcc 3121
 Glu Leu Glu Lys Leu Ala Asp Ala Ser Lys Lys Arg Ser Arg Lys Ala
 615 620 625 630

10 aaa ggc acg cgc tta act att gcg ggc tgg gtg atg agt gtg gaa tct 3169
 Lys Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ala Gly Trp Val Met Ser Val Glu Ser
 635 640 645

15 gag aca ggt gca tgg cct act atc gct gag gcg atg gtg gag ttt tcg 3217
 Glu Thr Gly Ala Trp Pro Thr Ile Ala Glu Ala Met Val Glu Phe Ser
 650 655 660

20 gtc tct aga gag act gta aaa agg gcg ctt aga tct gct gga att gag 3265
 Val Ser Arg Glu Thr Val Lys Arg Ala Leu Arg Ser Ala Gly Ile Glu
 665 670 675

25 ctt cca cgg ggc aga cga aag acc tca aat taaatggctc acttcgtaag 3315
 Leu Pro Arg Gly Arg Arg Lys Thr Ser Asn
 680 685

30 caatatacgg ttccccgtgc acagcacggg ggggcttaac tcttgctctt ttaagcttta 3375
 attaaatagt tcaggttata agcaatatac ggttttcctg gtcttggtgca gggaggccac 3435
 tttacttcgg cctttgaaag tgaattgtgt ttcaaattaa aggtgcttct gaagaccttt 3495
 aatctctagg gagtttttct gtaggaggca gttgggtcta gccagggttg ataagtgatt 3555

35 tcagtgagtg tccttctaga atgaaaagct tacgagtcgt ttaggcatat aacgggtgac 3615
 tagcgagttc agactttaaa agcgcaaaca aatttaatga ggtaatgcta tgagaaacgt 3675
 tcttttaact tgtccaatcc gtggcgagct tactgctact tcccttgctt ctgatgggct 3735
 tacgcctacc gaagaggcga tgaggattga tttgcttgag tttcttatag ataaacgtga 3795
 ctacccaaaa gattttattg atgttgaaac tgtggtgctg agcaatatcg gtaatgcagg 3855

40 gcgcaatagt cttcgtgcgg acgtcattgt gtatgacatc ccgaagatgc aagcacgggc 3915
 catgtcacat gaagaacgac taattcatgc gacgttgatc gcagagggtga aacgagaggg 3975
 gaaatacaag aaaagcgctg tttctcatca gttagttccg gcattgaagc tcgctccatc 4035

45 tatgaagaca cttggaattt actgggataa cgaggaaagg ctccctcttc agaagacttt 4095
 ttcagatgaa atgctttcgg ttgaagagat caccgttgca aaactcccaa agtgggggttt 4155

50 ttccctcaca ggaaaccccc tcacttacia tcaactttcc tctccgaaag atttgttcaa 4215
 aactctaagt ggtgtcgtg acattatgcg gagtgggtgga gtcgaagata aacaactgcg 4275
 ctatatcgaa acagtcaagt tgcttcttgc taggtataca gatgaacgca gtgcttctga 4335

55 tccacaagat aaaaacggcg gagttcttgt gatgcagatt ttgtctgacg gtgaccctaa 4395
 ctttcgaaac cgaatggatg atctctataa gcgttcagcc gcgcgttaca gcaaagcgaa 4455

gactctattc gcgaataaga cgtcacagct tgatgatgcc acgctccgtc aattagtggg 4515
 aaagattcaa ggttttcggt taac 4539

5

<210> 2
 <211> 199
 <212> ParA(pTET3)-PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

10

<400> 2
 Met Ser Ile Leu Thr Ile Ala His Thr Lys Gly Gly Val Gly Lys Thr
 1 5 10 15

15

Thr Ser Ala Val Leu Leu Cys Ala Ala Ala His Ala Arg Gly Leu Ala
 20 25 30

Val Thr Leu Ile Asp Ser Asp Ala Gln Gly Thr Ala Thr Ala Trp Ala
 35 40 45

20

His Ala Ala Glu Glu Ala Gly Asp Thr Phe Pro Trp Pro Ile Ile Thr
 50 55 60

Ala Ala Thr Pro Ala His Leu Ala Arg Thr Leu Asp Gly His Asn Gly
 25 65 70 75 80

Leu Val Ile Val Asp Thr Pro Pro Gly Gly Tyr Glu Val Ile Glu Thr
 85 90 95

30

Ala Ile Glu Ala Gly Asp Leu Ile Leu Ile Pro Thr Ser Ala Ser Pro
 100 105 110

Leu Asp Ile Asn Arg Val Trp Pro Thr Val Glu Ala Thr Ser His Lys
 115 120 125

35

Pro Ala Val Val Cys Leu Ser Gln Ile Asp Ser Arg Thr Thr Leu Pro
 130 135 140

Lys Ile Ala Arg Thr Ala Leu Glu Asn Glu Gly Val Val Val Ala Glu
 40 145 150 155 160

Thr Glu Ile Pro Ala Arg Glu Ala Leu Arg His Met Tyr Ala Thr Thr
 165 170 175

45

Pro Gln Arg Leu Tyr Gly Tyr Asp Glu Leu Leu Thr Glu Leu Leu Ser
 180 185 190

Ser Asn Leu Leu Gly Glu His
 195

50

<210> 3
 <211> 489
 <212> RepA(pTET3)-PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

55

<400> 3
 Met Ser Leu Pro Ser Lys Gly Arg Ser Ser Thr Pro Thr Gly Val Arg
 1 5 10 15

Val Ala Gln Pro Leu Pro Thr His Arg Asp Thr Gly Gly Leu Asp Asp
 20 25 30
 5 Thr Pro Ala Gly Phe Thr Asp Arg Asp Ala Leu Ile Asp His Leu Gly
 35 40 45
 Arg Lys Ala Ile His Gly Ser Lys Asp Arg Asp Phe Gly Lys Ala Tyr
 50 55 60
 10 Tyr Arg His Glu Asp Gly Thr Leu Arg Pro Arg Leu Tyr Arg Val Asp
 65 70 75 80
 Ser Glu Ala Leu Thr Arg Cys Gln Tyr Val Met Leu Thr Thr Gln Gln
 85 90 95
 Tyr Ala Ala Val Leu Val Val Asp Ile Asp Gln Pro Gly Gln Ser Gly
 100 105 110
 20 Gly His Pro Ala Asn Leu Ser Pro Glu Val Arg Gln Lys Met Ala Ala
 115 120 125
 Leu Ile Glu His Asn Leu Gly Pro Ser Trp Val Gly Ile Asn Pro Gln
 130 135 140
 25 Asn Gly Lys Ala Gln Ala Ile Trp Leu Ile Asp Pro Val Tyr Ala Asp
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Lys Ser Arg His Met Ser Leu Leu Ala Ala Thr Ser Arg
 165 170 175
 30 Ala Leu Gly Glu Leu Leu Asp His Asp Pro Asn Phe Ser His Arg Phe
 180 185 190
 35 Ser Arg Ser Pro Phe Tyr Asp Gly Asn Asp Pro Thr Ala Tyr Arg Trp
 195 200 205
 Tyr Cys Gln His Lys His Val Arg Arg Leu Ala Asp Leu Leu Lys Glu
 210 215 220
 40 Ile Arg Thr Met Thr Gly Gln Glu Gln Tyr Thr Lys Pro Gln Gln Gln
 225 230 235 240
 Phe Ser Ser Gly Arg Glu Leu Ile Asn Ala Val Lys Thr Arg Arg Glu
 245 250 255
 45 Glu Ala Gln Ala Phe Lys Ala Leu Ala Gln Asp Val Glu Thr Glu Leu
 260 265 270
 50 Ser Thr Glu Leu Asp Gln Tyr Asp Pro Glu Leu Ile Glu Gly Val Arg
 275 280 285
 Val Leu Trp Ile Ser Gln Gly Arg Ala Ala Arg Asp Glu Thr Ala Phe
 290 295 300
 55 Arg Tyr Ala Leu Lys Thr Cys His Arg Leu Arg Ala Ala Gly Glu Arg
 305 310 315 320

Met Thr Asp Ala Ala Ile Ile Asp Ala Tyr Glu His Ala Tyr Asn Val
 325 330 335
 5 Ala Gln Arg His Gly Gly Asp Gly Arg Asp Ser Glu Met Pro Pro Met
 340 345 350
 Arg Asp Arg Gln Thr Met Ala Arg Arg Val Arg Gly Tyr Val Thr Gln
 355 360 365
 10 Ser Lys Thr Ser Met Gly Ala Ser Ala Pro Pro Gly Arg Ala Thr Ser
 370 375 380
 Thr Glu Arg Lys Ala Leu Ser Thr Met Gly Arg Arg Gly Gly Lys Lys
 15 385 390 395 400
 Ala Ala Glu Arg Trp Lys Asp Arg Glu Ser His Tyr Ala Gln Thr Glu
 405 410 415
 20 Leu Glu Lys Leu Ala Asp Ala Ser Lys Lys Arg Ser Arg Lys Ala Lys
 420 425 430
 Gly Thr Arg Leu Thr Ile Ala Gly Trp Val Met Ser Val Glu Ser Glu
 435 440 445
 25 Thr Gly Ala Trp Pro Thr Ile Ala Glu Ala Met Val Glu Phe Ser Val
 450 455 460
 Ser Arg Glu Thr Val Lys Arg Ala Leu Arg Ser Ala Gly Ile Glu Leu
 30 465 470 475 480
 Pro Arg Gly Arg Arg Lys Thr Ser Asn
 485
 35
 <210> 4
 <211> 1856
 <212> DNA
 40 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6
 <220>
 <221> CDS
 <222> (338)..(1291)
 45 <223> repA
 <400> 4
 gcatgccaat aaaagtcaac ccgccgtggc caccctaaac cagagtgtaa ataaacattg 60
 50 agatagcttg atacctagac atctttccgc ctgataccta gacattaaga cgtctagatt 120
 gcttgctatc tacaaccct caccagggga cttaaattaat attccaacaa agaaggactc 180
 ccatgttttc gtattctaaa tatcgaatac ctgatcggcg ttctgggcag ctatgtcaca 240
 55 tgtgactgct acgatcaggg gaaaattaaa agacctggca ctgccgcaaa cagtccaggt 300

	catgacccca cactatttct aagagacatg aggattt atg gat gat cat act ctg	355
	Met Asp Asp His Thr Leu	
	1 5	
5	cca cag cca gat tgc ggc aac tca gat cca att agc gat ttg gaa gcg	403
	Pro Gln Pro Asp Ser Gly Asn Ser Asp Pro Ile Ser Asp Leu Glu Ala	
	10 15 20	
10	cgc ctc gca gag atc gag gct ggc ctc ggc gat ccg ctc agt ttc acg	451
	Arg Leu Ala Glu Ile Glu Ala Gly Leu Gly Asp Pro Leu Ser Phe Thr	
	25 30 35	
15	tca aaa acc ctg atc cag gca act ttt cca cac agt gca aaa gcc gga	499
	Ser Lys Thr Leu Ile Gln Ala Thr Phe Pro His Ser Ala Lys Ala Gly	
	40 45 50	
20	aaa gaa ctt gtc ctg gtt aac ggc cat acg aca gtc acg atg tac agc	547
	Lys Glu Leu Val Leu Val Asn Gly His Thr Thr Val Thr Met Tyr Ser	
	55 60 65 70	
25	cgc cac ggc ctg cca tat ggc tca tgg cca ccg ctc att atg tgc tgg	595
	Arg His Gly Leu Pro Tyr Gly Ser Trp Pro Arg Leu Ile Met Cys Trp	
	75 80 85	
30	cta aca agg gaa gcc ctt cgc cgc caa aat ctc cca att gat gag gct	643
	Leu Thr Arg Glu Ala Leu Arg Arg Gln Asn Leu Pro Ile Asp Glu Ala	
	90 95 100	
35	cgt gaa atc ccg ctt aat tca agc ttg agt ggt ttt atg ccg gaa gtt	691
	Arg Glu Ile Pro Leu Asn Ser Ser Leu Ser Gly Phe Met Arg Glu Val	
	105 110 115	
40	ggc atc gga cgt gca acc gga ggg gag cgt ggc acg atc acc gcg ctg	739
	Gly Ile Gly Arg Ala Thr Gly Gly Glu Arg Gly Thr Ile Thr Ala Leu	
	120 125 130	
45	aaa aag cag atg ccg tct ctt ttc tcc act tca atc ggc att gac atc	787
	Lys Lys Gln Met Arg Ser Leu Phe Ser Thr Ser Ile Gly Ile Asp Ile	
	135 140 145 150	
50	aaa gga gat gac gac ctt aag ctc ctg gat ctt gat gaa tca gtt atc	835
	Lys Gly Asp Asp Asp Leu Lys Leu Leu Asp Leu Asp Glu Ser Val Ile	
	155 160 165	
55	gct gag ccg acg gag atg tgg tgg acg ccg cga ccc cac gat gac atc	883
	Ala Glu Arg Thr Glu Met Trp Trp Thr Pro Arg Pro His Asp Asp Ile	
	170 175 180	
60	gat ttt gag gga tat att cga ctc tcc gct act ttc tac tca gat ctc	931
	Asp Phe Glu Gly Tyr Ile Arg Leu Ser Ala Thr Phe Tyr Ser Asp Leu	
	185 190 195	
65	atc aaa tca gcc gtc ccc ctc gac acc cga atc ctc ccg agt cta aag	979
	Ile Lys Ser Ala Val Pro Leu Asp Thr Arg Ile Leu Arg Ser Leu Lys	
	200 205 210	

5 aaa tct ccg atg gcc atc gat gtc tac tct tgg ctc acc tac aga gtt 1027
 Lys Ser Pro Met Ala Ile Asp Val Tyr Ser Trp Leu Thr Tyr Arg Val
 215 220 225 230

10 tca tac ttg cgc tac ccc aca gta att aag tgg gat cag atc caa gga 1075
 Ser Tyr Leu Arg Tyr Pro Thr Val Ile Lys Trp Asp Gln Ile Gln Gly
 235 240 245

15 cag cta ggc gct ggc tac cct gac act tct caa gga atg cga aac ttc 1123
 Gln Leu Gly Ala Gly Tyr Pro Asp Thr Ser Gln Gly Met Arg Asn Phe
 250 255 260

20 agg aag aaa ttt ttg atc gcc ctc aac aaa gtc att gac gta tgg ccc 1171
 Arg Lys Lys Phe Leu Ile Ala Leu Asn Lys Val Ile Asp Val Trp Pro
 265 270 275

25 acc gac tcg atc agc atc gta aaa aac gga att cta ctg acc cct ggt 1219
 Thr Asp Ser Ile Ser Ile Val Lys Asn Gly Ile Leu Leu Thr Pro Gly
 280 285 290

30 tca cca agc gtt ccc cgc aga gca cag gat gag ttc caa aaa cgc ttt 1267
 Ser Pro Ser Val Pro Arg Arg Ala Gln Asp Glu Phe Gln Lys Arg Phe
 295 300 305 310

35 tcg att ggt gat gat cca ctt ttt taaatcgata agtccccgca cttaggagtg 1321
 Ser Ile Gly Asp Asp Pro Leu Phe
 315

40 cggggatttt tcatgccc aa atacgtgcgc agtaacggta ccgcccgtgc gcagtaacgg 1381
 taccgcccgt gcgcagtaac ggtaccgccc gtgcgcagta acggtaccgc ccgtgcgcag 1441
 taacggtacc ggaacctatt atatattagc aggtcaaagt atgtttccaa ggtctcccct 1501
 ataggtcctt tagggcctat acaaccttta caactaccta tatgcaaaga aacttcaatt 1561
 catgttcggg tagcagaaaa ttgtccgaaa ctagcggttac acgaaatgca aatacgtatc 1621
 taagtatatata actgaaatat aaaaacggca gaccgtaatt attaattaga aaacccgccc 1681
 tggaattatc caaagcggga ataaaagggt taagggaac tagcgagcat tttctgattt 1741
 ctcggcatta ggaccgaccc acttccctct acgaccaaac tgttttgtgt cagaggggtg 1801
 tgcacactca gtgtcatgac cttatgcaca ctcaatctca tgacctgtg catgc 1856

50 <210> 5
 <211> 318
 <212> RepA(pCRY4)-PRT
 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

55 <400> 5
 Met Asp Asp His Thr Leu Pro Gln Pro Asp Ser Gly Asn Ser Asp Pro
 1 5 10 15
 Ile Ser Asp Leu Glu Ala Arg Leu Ala Glu Ile Glu Ala Gly Leu Gly
 20 25 30

Asp Pro Leu Ser Phe Thr Ser Lys Thr Leu Ile Gln Ala Thr Phe Pro
 35 40 45
 5 His Ser Ala Lys Ala Gly Lys Glu Leu Val Leu Val Asn Gly His Thr
 50 55 60
 Thr Val Thr Met Tyr Ser Arg His Gly Leu Pro Tyr Gly Ser Trp Pro
 65 70 75 80
 10 Arg Leu Ile Met Cys Trp Leu Thr Arg Glu Ala Leu Arg Arg Gln Asn
 85 90 95
 Leu Pro Ile Asp Glu Ala Arg Glu Ile Pro Leu Asn Ser Ser Leu Ser
 100 105 110
 Gly Phe Met Arg Glu Val Gly Ile Gly Arg Ala Thr Gly Gly Glu Arg
 115 120 125
 20 Gly Thr Ile Thr Ala Leu Lys Lys Gln Met Arg Ser Leu Phe Ser Thr
 130 135 140
 Ser Ile Gly Ile Asp Ile Lys Gly Asp Asp Asp Leu Lys Leu Leu Asp
 145 150 155 160
 25 Leu Asp Glu Ser Val Ile Ala Glu Arg Thr Glu Met Trp Trp Thr Pro
 165 170 175
 Arg Pro His Asp Asp Ile Asp Phe Glu Gly Tyr Ile Arg Leu Ser Ala
 180 185 190
 Thr Phe Tyr Ser Asp Leu Ile Lys Ser Ala Val Pro Leu Asp Thr Arg
 195 200 205
 35 Ile Leu Arg Ser Leu Lys Lys Ser Pro Met Ala Ile Asp Val Tyr Ser
 210 215 220
 Trp Leu Thr Tyr Arg Val Ser Tyr Leu Arg Tyr Pro Thr Val Ile Lys
 225 230 235 240
 40 Trp Asp Gln Ile Gln Gly Gln Leu Gly Ala Gly Tyr Pro Asp Thr Ser
 245 250 255
 Gln Gly Met Arg Asn Phe Arg Lys Lys Phe Leu Ile Ala Leu Asn Lys
 260 265 270
 45 Val Ile Asp Val Trp Pro Thr Asp Ser Ile Ser Ile Val Lys Asn Gly
 275 280 285
 50 Ile Leu Leu Thr Pro Gly Ser Pro Ser Val Pro Arg Arg Ala Gln Asp
 290 295 300
 Glu Phe Gln Lys Arg Phe Ser Ile Gly Asp Asp Pro Leu Phe
 305 310 315
 55

<210> 6

<211> 7316

<212> DNA
 <213> *Corynebacterium glutamicum* LP-6

<220>
 5 <221> gene
 <222> Complement((1447)..(2013))
 <223> tetR

<220>
 10 <221> CDS
 <222> (2124)..(3272)
 <223> tetA

<220>
 15 <221> CDS
 <222> (5882)..(6718)
 <223> aadA

<400> 6
 20 aagcttgagc atgcttggcg gagattggac ggacggaacg atgacggatt tcaagtggcg 60
 ccatttccag ggtgatgtga tctgtgggc ggtgcgctgg tattgtcgct atccgatcag 120
 ctatcgcgac cttgaggaaa tgctggcgga acgcggcatt tcggtcgacc atacgacgat 180
 25 ctatcgctgg gtccagtgtc acgccccgga gatggagaag cggctgcgct gggttctggcg 240
 gcgtggcttt gatccgagct ggcgcctgga tgaaacctac gtcaaggtgc ggggcaagtg 300
 30 gacctacctg taccgggcag tcgacaagcg gggcgacacg atcgatttct acctgtcgcc 360
 gacccgcagc gccaaaggcag cgaagcggtt cctgggcaag gccctgcgag gcctgaagca 420
 ctgggaaaag cctgccacgc tcaataccga caaagcgccg agctatggtg cagcgatcac 480
 35 cgaattgaag cgcgaaggaa agctggaccg ggagacggcc caccggcagg tgaagtatct 540
 caataacgtg atcgaggccg atcacggaaa gctcaagata ctgatcaagc cggtgcgcg 600
 40 tttcaaatac atccccacgg cctatgccac gatcaaggga ttcgaagtca tgcgagccct 660
 gcgcaaagga caggctcgcc cctggtgcct gcagcccggc atcaggggcg aggtgcgct 720
 tgtggagaga gcttttggca ttgggcctc ggcgtgacg gaggccatgg gcatgctcaa 780
 45 ccaccatttc gcagcagccg cctgatcggc gcagagcgac agcctacctc tgactgccgc 840
 caatctttgc aacagagcct ttgctcaat gcaggagat agcgaagagc gcgcttcaac 900
 50 ggagatgctc gaatgggtcc acgacggatt ggagtccgtg gtcgcggcag acgtagatga 960
 ttcgcacgcc gtacccgtcg gcgccgtcg gctcggggtc gcattctgcg cggcagacgt 1020
 tacagagccg gtgctcgttg ctccccaga ccgtgacctc gatatcgctg gggatctcca 1080
 55 ttccgtcgaa ctccatatgc ggaggttagc tgctcgggat tgagtcgtgt caagatgcgg 1140
 caccgatgct aaaccgccgt tacctatggt catcgcgccg gtcgcgcact cgacgcttag 1200

	ttcttgaggt	actcgaggac	ggcgatgacg	cgcttggtcc	ctgtgcgctc	gttaagggtc	1260										
	agcatggtga	agatgctgct	gatgtgccgt	tccgcgatcg	cgacgcgaca	tgcacacggt	1320										
5	ccctgatttg	ctcgtttgtg	agccccgtag	ccatgagcga	atcgtcagta	tcgcggagga	1380										
	ggtgctgcgg	gagcgggaaa	ggattgacct	tactgacgca	gagacccaaa	gtgcgagcat	1440										
10	ccctcatcgc	tttgatgcca	gcccttcaac	cattgcaact	aaccggaact	cgaaatctag	1500										
	gtcttgatcg	acaggctcac	atccgttgtc	gagcgtgttt	tgttcttcta	gtacgaaacc	1560										
	gaccgtatag	cggctgatag	ccatgagagc	tcggaccgca	gagccctcag	cgaatccttc	1620										
15	ggacacgaga	aactcgatct	gactttcggg	ggcatccgag	cccgtggca	tctggtcact	1680										
	cttttgacgg	tgaaactctg	cgtgcagccg	tgctccatcc	cggactgcca	gaagcgctgt	1740										
	ccggaagctc	cgcgcgttgc	gcaggagaaa	gtcgtcccag	cgctcccctg	actctgggag	1800										
20	tgaggcggtg	tgttcgcgat	caagcacatc	agctgcgagc	gatccgagca	ggtgggcctt	1860										
	tgtccgaaa	tgccagtaga	gcgctggctg	ctgcaccgcg	agatgcgcag	ccagcgcccc	1920										
25	tgtggtgaaa	ccgtcgatcc	ccgtgttatt	gagcacatgc	ctcgcaccgc	gcaagactgc	1980										
	tgcacgatcg	agtcgcgctt	gtttctgagc	catgcttgca	ctttatcatc	gataacttta	2040										
	tcgttgataa	ggtgtcatct	ctcacttccg	ctcgtggctc	gttggccacg	gtcctcatca	2100										
30	cggetagcct	cgacgccgcc	ggc	atg	ggc	ctg	gtg	atg	ccg	att	ctt	ccc	gca	2153			
				Met	Gly	Leu	Val	Met	Pro	Ile	Leu	Pro	Ala				
				1				5					10				
35	ctg	cta	cac	gag	gca	ggg	gtc	acc	gct	gat	gcg	gtt	ccg	ctg	aac	gtc	2201
	Leu	Leu	His	Glu	Ala	Gly	Val	Thr	Ala	Asp	Ala	Val	Pro	Leu	Asn	Val	
					15					20					25		
40	gga	gtg	ctg	atc	gcg	ctc	tac	gcg	gta	atg	cag	ttc	atc	ttt	gcc	ccc	2249
	Gly	Val	Leu	Ile	Ala	Leu	Tyr	Ala	Val	Met	Gln	Phe	Ile	Phe	Ala	Pro	
					30					35					40		
	gta	ctg	gga	acg	ctg	tcg	gac	cga	ttc	ggc	cg	cg	cg	gtg	ctg	ctt	2297
45	Val	Leu	Gly	Thr	Leu	Ser	Asp	Arg	Phe	Gly	Arg	Arg	Arg	Val	Leu	Leu	
					45					50					55		
	gtt	tcc	ctg	gcc	ggt	gcg	acc	gtc	gac	tat	ctc	gtg	ctc	gcc	acg	acg	2345
	Val	Ser	Leu	Ala	Gly	Ala	Thr	Val	Asp	Tyr	Leu	Val	Leu	Ala	Thr	Thr	
					60					65					70		
50	tcc	gct	ctg	tcg	gtg	ttc	tat	atc	gcc	cg	gca	gtg	gct	ggg	ata	acc	2393
	Ser	Ala	Leu	Ser	Val	Phe	Tyr	Ile	Ala	Arg	Ala	Val	Ala	Gly	Ile	Thr	
					75					80					85		
55	gga	gcg	acc	aat	gcg	gtc	acc	gcc	acc	gtg	atc	gcc	gac	atc	acg	cca	2441
	Gly	Ala	Thr	Asn	Ala	Val	Thr	Ala	Thr	Val	Ile	Ala	Asp	Ile	Thr	Pro	
					95					100					105		

	ccc	cac	cag	cgc	gcc	aag	cgt	ttc	ggg	tta	ctc	agt	gcc	tgc	tat	ggc	2489
	Pro	His	Gln	Arg	Ala	Lys	Arg	Phe	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Cys	Tyr	Gly	
			110						115					120			
5	ggc	gga	atg	atc	gcg	ggg	cca	gcc	atg	ggg	gga	ctg	ttc	ggg	gcc	atc	2537
	Gly	Gly	Met	Ile	Ala	Gly	Pro	Ala	Met	Gly	Gly	Leu	Phe	Gly	Ala	Ile	
			125					130					135				
10	tcg	cca	cat	ctg	ccg	ttt	ttg	ctc	gct	gct	ctt	ctc	tca	gcg	agc	aat	2585
	Ser	Pro	His	Leu	Pro	Phe	Leu	Leu	Ala	Ala	Leu	Leu	Ser	Ala	Ser	Asn	
		140					145					150					
15	ctg	gca	ctc	acc	ttt	atc	ctg	tta	cgc	gag	acc	cgt	cct	gat	tcc	cct	2633
	Leu	Ala	Leu	Thr	Phe	Ile	Leu	Leu	Arg	Glu	Thr	Arg	Pro	Asp	Ser	Pro	
	155					160					165					170	
20	gcg	cgc	tct	gcg	tcg	ctc	gct	cag	cat	cgt	ggg	cgc	ccc	ggc	ctc	agc	2681
	Ala	Arg	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Gln	His	Arg	Gly	Arg	Pro	Gly	Leu	Ser	
					175					180					185		
25	gcg	gtg	cct	ggg	att	acc	ttc	cta	tta	atc	gca	ttc	ggc	ctt	gtt	caa	2729
	Ala	Val	Pro	Gly	Ile	Thr	Phe	Leu	Leu	Ile	Ala	Phe	Gly	Leu	Val	Gln	
				190					195					200			
30	ttc	att	ggg	cag	gct	cca	ggg	gcg	acc	tgg	gtg	ctg	ttt	act	gaa	cac	2777
	Phe	Ile	Gly	Gln	Ala	Pro	Gly	Ala	Thr	Trp	Val	Leu	Phe	Thr	Glu	His	
			205				210						215				
35	cgc	ctc	gac	tgg	agt	ccc	gtc	gaa	gtt	gga	atc	tcc	ctg	tcc	gtt	ttc	2825
	Arg	Leu	Asp	Trp	Ser	Pro	Val	Glu	Val	Gly	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Phe	
		220					225					230					
40	ggg	atc	gta	cag	gtt	ctc	gtg	cag	gcc	ctc	ctt	act	ggc	cgc	atc	gtg	2873
	Gly	Ile	Val	Gln	Val	Leu	Val	Gln	Ala	Leu	Leu	Thr	Gly	Arg	Ile	Val	
	235					240					245					250	
45	gag	tgg	atc	ggg	gag	gca	aaa	aca	gtc	atc	atc	ggg	tgt	att	acc	gac	2921
	Glu	Trp	Ile	Gly	Glu	Ala	Lys	Thr	Val	Ile	Ile	Gly	Cys	Ile	Thr	Asp	
				255					260						265		
50	gcc	ttg	ggg	ctc	gta	ggc	ctg	gcg	att	gtc	act	gac	gca	ttt	tcc	atg	2969
	Ala	Leu	Gly	Leu	Val	Gly	Leu	Ala	Ile	Val	Thr	Asp	Ala	Phe	Ser	Met	
				270				275						280			
55	gca	cct	atc	ttg	gcg	gca	ctg	ggg	atc	ggg	ggc	atc	ggc	ctc	ccc	gct	3017
	Ala	Pro	Ile	Leu	Ala	Ala	Leu	Gly	Ile	Gly	Gly	Ile	Gly	Leu	Pro	Ala	
			285				290						295				
60	ctg	caa	acc	ctt	ctc	tcc	cag	cgc	gtc	gat	gaa	cag	cac	caa	ggg	cgc	3065
	Leu	Gln	Thr	Leu	Leu	Ser	Gln	Arg	Val	Asp	Glu	Gln	His	Gln	Gly	Arg	
		300					305					310					
65	ctc	cag	ggg	gtg	ctc	gcc	agc	atc	aac	agc	gtc	aca	tcg	atc	ttc	gga	3113
	Leu	Gln	Gly	Val	Leu	Ala	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Thr	Ser	Ile	Phe	Gly	
	315					320					325					330	

ccg gtc gct ttc aca acg atc ttc gcg ctc act tac atc aac gcc gac 3161
 Pro Val Ala Phe Thr Thr Ile Phe Ala Leu Thr Tyr Ile Asn Ala Asp
 335 340 345

5

ggc ttc ctc tgg ctc tgc gcc gca gca ctc tac gtg ccc tgc gtg att 3209
 Gly Phe Leu Trp Leu Cys Ala Ala Ala Leu Tyr Val Pro Cys Val Ile
 350 355 360

10

ctc atc atg cgt ggt aca gca gcg tcc ccg aag ttc ggc tct tgg gcg 3257
 Leu Ile Met Arg Gly Thr Ala Ala Ser Pro Lys Phe Gly Ser Trp Ala
 365 370 375

15

agc ggc gac tcg atg tgagttgtga gacgtgagca ggagcaaacac ggcggcgaca 3312
 Ser Gly Asp Ser Met
 380

20

ctgcttcgcc atggccgact agcgagacgg cgccaccggg aaactcggca tcatctacca 3372
 aggacaggtc agctgggagc ctgatagacc catcgaaatg tgcgtgccga tcgcggagaa 3432
 gggccggggc catcgatcgc agccatagca ccatgagtct tcacggaagt gcgtcgacgg 3492

25

agacttggtt gtgaaccggg ccaagggaga gctggaggcc ctctccgagt ggcttgccga 3552
 tgacatgagc tggacgctca tcgagaaatc cacacacagc ggccccagtg cagccccgaga 3612
 ggtgcgcccg ccgttctccc gagcgggtgg aggtcatttc tgcgtcacc cacggacgac 3672

30

gcgcttcctg cgacggctac ctcgaggctg gaggaatgcg cgtccgtttc agccatgcgt 3732
 tccgcttcgt cagcaccccc aagacctcga tgatcgacga actgcgacgc tactgcatcg 3792
 agacgcaggc tgactgaggc ctgtgcggac agcacgaacg acccttgagc ccgtaatctg 3852

35

ggaaccgcag aaactacccg atcgaaacgc aactactttg ccgaccctac ggggttggt 3912
 cgcggtcgtc gtccttggcc gggctctgtt gcaaaaatcg tgaagcttga gcatgcttgg 3972

40

cggagattgg acggacggaa cgatgacgga tttcaagtgg cgccatttcc aggggtgatgt 4032
 gatcctgtgg gcggtgcgct ggtattgtcg ctatccgacg agctatcgcg accttgagga 4092
 aatgctggcg gaacgcggca tttcggtcga ccatacgacg atctatcgct ggggtccagt 4152

45

ctacgccccg gagatggaga agcggctgcg ctggttctgg cggcgtggct ttgatccgag 4212
 ctggcgccctg gatgaaacct acgtcaaggt gcggggcaag tggacctacc tgtaccgggc 4272

50

agtcgacaag cggggcgaca cgatcgattt ctacctgtcg ccgaccgcga gcgccaaggc 4332
 agcgaagcgg ttcttgggca aggcctgcg aggcctgaag cactgggaaa agcctgccac 4392
 gctcaatacc gacaaagcgc cgagctatgg tgcagcgatc accgaattga agcgcgaagg 4452

55

aaagctggac cgggagacgg ccaccggca ggtgaagtat ctcaataacg tgatcgaggc 4512
 cgatcacgga aagctcaaga tactgatcaa gccggtgcgc ggtttcaa atcgatccccac 4572

ggcctatgcc acgatcaagg gattcgaagt catgcgagcc ctgcgcaaag gacaggctcg 4632
 cccttgggtgc ctgcagcccg gcatcagggg cgaggtgccc cttgtggaga gagcttttgg 4692
 5 cattggggccc tcggcgctga cggaggccat gggcatgctc aaccaccatt tcgcagcagc 4752
 cgctgatcg gcgcagagcg acagcctacc tctgactgcc gccaatcttt gcaacagagc 4812
 10 cgtcgtagag acgtcggaat ggccgagcag atcctgcacg gtctgaatgt cgtaaccgct 4872
 gcggagcaag gccgtcgca acgagtggcg gaggggtgtgc ggtgtggcg gcttcgtgat 4932
 gcctgcttgt tctacggcac gtttgaaggc gcgctgaaag gtctggatcat acatgtgatg 4992
 15 gcgacgcacg acaccgctcc gtggatcggg cgaatgcgtg tgctgcgcaa aaaccagaa 5052
 ccacggccag gaatgcccgg cgcgcggata cttccgctca agggcgctcg gaagcgcaac 5112
 gccgctgccc ccctcggcct ggctcctcag ccaccatgcc cgtgcacgcg acagctgctc 5172
 20 gcgcaggctg ggtgccaagc tctcgggtaa catcaaggcc cgatccttgg agcccttggc 5232
 ctcccgcacg atgatcgtgc cgtgatcgaa atccagatcc ttgaccgcga gttgcaaacc 5292
 25 ctactgatc cgcagccccg ttccatacag aagctgggcg aacaaacgat gctcgccttc 5352
 cagaaaaccg aggatgcgaa ccacttcac cggggtcagc accaccggca agcgcgcgca 5412
 cggccgaggt cttccgatct cctgaagcca gggcagatcc gtgcacagca ccttgccgta 5472
 30 gaagaacagc aaggccgcca atgcctgacg atgcgtggag accgaaacct tgcgctcggt 5532
 cgccagccag gacagaaatg cctcgacttc gctgctgccc aaggttgccg ggtgacgac 5592
 35 accgtggaaa cggatgaagg cacgaacca gtggacatac gcctgttcgg ttcgtaagct 5652
 ataatgcaag tagcgtatgc gctcacgcaa ctgggtccaga accttgaccg aacgcagcgg 5712
 40 tggtaacggt gcagtgtgg ttttcatggc ttgttatgac tgtttgttg tacagtctat 5772
 gcctcgggca tccaagcagc aagcgcgtta cgccgtgggt cgatgtttga tgttatggag 5832
 cagcaacgat gttacgcagc agggcagtcg ccctaaaaca aagttagac atg atg agc 5890
 45 Met Met Ser 385
 aac tct ata cac acc gga atc tca aga cag ctt tca cag gca cgc gat 5938
 Asn Ser Ile His Thr Gly Ile Ser Arg Gln Leu Ser Gln Ala Arg Asp
 390 395 400
 50 gta att aaa cgc cat ttg gca tca acg ctg aaa gcc ata cac ttg tat 5986
 Val Ile Lys Arg His Leu Ala Ser Thr Leu Lys Ala Ile His Leu Tyr
 405 410 415
 55 ggt tct gca att gat ggt ggc ctc aaa cca tat agc gac att gat ctg 6034
 Gly Ser Ala Ile Asp Gly Gly Leu Lys Pro Tyr Ser Asp Ile Asp Leu
 420 425 430

	ctg gtt acc gtg gat gca cgc ttg gat gaa gct acc aga cgc tcc ctg	6082
	Leu Val Thr Val Asp Ala Arg Leu Asp Glu Ala Thr Arg Arg Ser Leu	
	435 440 445 450	
5	atg ctc gat ttc ttg aat atc tcg gca cca cca tgc gaa agc tca ata	6130
	Met Leu Asp Phe Leu Asn Ile Ser Ala Pro Pro Cys Glu Ser Ser Ile	
	455 460 465	
10	ctc cgg ccg cta gag gta act gtt gtt gca tgc aac gaa gta gtg cct	6178
	Leu Arg Pro Leu Glu Val Thr Val Val Ala Cys Asn Glu Val Val Pro	
	470 475 480	
15	tgg cgt tat ccg gca cga cga gaa ctg cag ttc ggg gag tgg ctg cgg	6226
	Trp Arg Tyr Pro Ala Arg Arg Glu Leu Gln Phe Gly Glu Trp Leu Arg	
	485 490 495	
20	gag gat att ctt gaa ggt gtc ttc gag cca gcc gcc ttg gac gcc gac	6274
	Glu Asp Ile Leu Glu Gly Val Phe Glu Pro Ala Ala Leu Asp Ala Asp	
	500 505 510	
25	ctt gca att cta ata acg aaa gct agg caa cac agc atc gct tta gta	6322
	Leu Ala Ile Leu Ile Thr Lys Ala Arg Gln His Ser Ile Ala Leu Val	
	515 520 525 530	
30	ggt cca gtg gct caa aaa gtc ttc atg ccg gtg cca gag cat gac ttt	6370
	Gly Pro Val Ala Gln Lys Val Phe Met Pro Val Pro Glu His Asp Phe	
	535 540 545	
35	ctc cag gtg ctt tcc gat acc ctt aag ctg tgg aat act cat gag gat	6418
	Leu Gln Val Leu Ser Asp Thr Leu Lys Leu Trp Asn Thr His Glu Asp	
	550 555 560	
40	tgg gaa aat gag gag cgg aac atc gta ctc acg tta gct cgg atc tgg	6466
	Trp Glu Asn Glu Glu Arg Asn Ile Val Leu Thr Leu Ala Arg Ile Trp	
	565 570 575	
45	tat agc act gaa act gga gga atc gtc ccc aag gat gtg gcc gcc gaa	6514
	Tyr Ser Thr Glu Thr Gly Gly Ile Val Pro Lys Asp Val Ala Ala Glu	
	580 585 590	
50	tgg gtt tta gag cgc ttg cca gct gag cat aag cca ata ctg gtt gag	6562
	Trp Val Leu Glu Arg Leu Pro Ala Glu His Lys Pro Ile Leu Val Glu	
	595 600 605 610	
55	gcg cgg caa gcc tat ctt ggg ctt tgc aag gat agt ctt gct ttg cgt	6610
	Ala Arg Gln Ala Tyr Leu Gly Leu Cys Lys Asp Ser Leu Ala Leu Arg	
	615 620 625	
60	gca gat gag act tcg gcg ttc att ggc tat gca aag tct gcg gtc gct	6658
	Ala Asp Glu Thr Ser Ala Phe Ile Gly Tyr Ala Lys Ser Ala Val Ala	
	630 635 640	
65	gat ttg ctc gaa aag cga aaa tct caa act tcg cat att tgc gat ggc	6706
	Asp Leu Leu Glu Lys Arg Lys Ser Gln Thr Ser His Ile Cys Asp Gly	
	645 650 655	

gcc aag aac gtc taacgtctaa ctattcattt aagccgaagc cgcttcgcgg 6758
 Ala Lys Asn Val
 660

5 ctcggtttaa ttcaggcgtt agatgcacta agcacataat tgctcacagc caaactatca 6818
 ggtcaagtct gcttttatta tttttaagcg tgcataataa gccctacaca aattgggaga 6878
 10 tatatcatga aaggctggct ttttcttggt atcgcaatag ttggcgaagt aatcgcaaca 6938
 tccgcattaa aatctagcga gggctttact aagcttgccc cttccgccgt tgcataatc 6998
 ggttatggca tcgcatttta ttttctttct ctggttctga aatccatccc tgcggtggtt 7058
 15 gcttatgcag tctggtcggg actcggcgtc gtcataatta cagccattgc ctggttgctt 7118
 catgggcaaa agcttgatgc gtggggcttt gtaggtatgg ggctcataat tgctgccttt 7178
 20 ttgctcgccc gatccccatc gtggaagtcg ctgcggaggc cgacgccatg gtgacggtgt 7238
 tcggcattct gaatctcacc gaggactcct tcttcgatga gagccggcgg ctagaccccg 7298
 ccggcgctgt caccgcgg 7316
 25

<210> 7
 <211> 383
 <212> TetA-PRT
 30 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

<400> 7
 Met Gly Leu Val Met Pro Ile Leu Pro Ala Leu Leu His Glu Ala Gly
 1 5 10 15
 35 Val Thr Ala Asp Ala Val Pro Leu Asn Val Gly Val Leu Ile Ala Leu
 20 25 30
 Tyr Ala Val Met Gln Phe Ile Phe Ala Pro Val Leu Gly Thr Leu Ser
 35 40 45
 Asp Arg Phe Gly Arg Arg Arg Val Leu Leu Val Ser Leu Ala Gly Ala
 50 55 60
 45 Thr Val Asp Tyr Leu Val Leu Ala Thr Thr Ser Ala Leu Ser Val Phe
 65 70 75 80
 Tyr Ile Ala Arg Ala Val Ala Gly Ile Thr Gly Ala Thr Asn Ala Val
 85 90 95
 50 Thr Ala Thr Val Ile Ala Asp Ile Thr Pro Pro His Gln Arg Ala Lys
 100 105 110
 Arg Phe Gly Leu Leu Ser Ala Cys Tyr Gly Gly Gly Met Ile Ala Gly
 115 120 125
 55 Pro Ala Met Gly Gly Leu Phe Gly Ala Ile Ser Pro His Leu Pro Phe
 130 135 140

Leu Leu Ala Ala Leu Leu Ser Ala Ser Asn Leu Ala Leu Thr Phe Ile
 145 150 155 160
 5 Leu Leu Arg Glu Thr Arg Pro Asp Ser Pro Ala Arg Ser Ala Ser Leu
 165 170 175
 Ala Gln His Arg Gly Arg Pro Gly Leu Ser Ala Val Pro Gly Ile Thr
 180 185 190
 10 Phe Leu Leu Ile Ala Phe Gly Leu Val Gln Phe Ile Gly Gln Ala Pro
 195 200 205
 Gly Ala Thr Trp Val Leu Phe Thr Glu His Arg Leu Asp Trp Ser Pro
 210 215 220
 15 Val Glu Val Gly Ile Ser Leu Ser Val Phe Gly Ile Val Gln Val Leu
 225 230 235 240
 Val Gln Ala Leu Leu Thr Gly Arg Ile Val Glu Trp Ile Gly Glu Ala
 245 250 255
 20 Lys Thr Val Ile Ile Gly Cys Ile Thr Asp Ala Leu Gly Leu Val Gly
 260 265 270
 25 Leu Ala Ile Val Thr Asp Ala Phe Ser Met Ala Pro Ile Leu Ala Ala
 275 280 285
 Leu Gly Ile Gly Gly Ile Gly Leu Pro Ala Leu Gln Thr Leu Leu Ser
 290 295 300
 30 Gln Arg Val Asp Glu Gln His Gln Gly Arg Leu Gln Gly Val Leu Ala
 305 310 315 320
 Ser Ile Asn Ser Val Thr Ser Ile Phe Gly Pro Val Ala Phe Thr Thr
 325 330 335
 35 Ile Phe Ala Leu Thr Tyr Ile Asn Ala Asp Gly Phe Leu Trp Leu Cys
 340 345 350
 40 Ala Ala Ala Leu Tyr Val Pro Cys Val Ile Leu Ile Met Arg Gly Thr
 355 360 365
 Ala Ala Ser Pro Lys Phe Gly Ser Trp Ala Ser Gly Asp Ser Met
 370 375 380
 45
 <210> 8
 <211> 279
 <212> AadA-PRT
 50 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6
 <400> 8
 Met Met Ser Asn Ser Ile His Thr Gly Ile Ser Arg Gln Leu Ser Gln
 1 5 10 15
 55 Ala Arg Asp Val Ile Lys Arg His Leu Ala Ser Thr Leu Lys Ala Ile
 20 25 30

His Leu Tyr Gly Ser Ala Ile Asp Gly Gly Leu Lys Pro Tyr Ser Asp
 35 40 45
 5 Ile Asp Leu Leu Val Thr Val Asp Ala Arg Leu Asp Glu Ala Thr Arg
 50 55 60
 Arg Ser Leu Met Leu Asp Phe Leu Asn Ile Ser Ala Pro Pro Cys Glu
 65 70 75 80
 10 Ser Ser Ile Leu Arg Pro Leu Glu Val Thr Val Val Ala Cys Asn Glu
 85 90 95
 Val Val Pro Trp Arg Tyr Pro Ala Arg Arg Glu Leu Gln Phe Gly Glu
 15 100 105 110
 Trp Leu Arg Glu Asp Ile Leu Glu Gly Val Phe Glu Pro Ala Ala Leu
 115 120 125
 20 Asp Ala Asp Leu Ala Ile Leu Ile Thr Lys Ala Arg Gln His Ser Ile
 130 135 140
 Ala Leu Val Gly Pro Val Ala Gln Lys Val Phe Met Pro Val Pro Glu
 25 145 150 155 160
 His Asp Phe Leu Gln Val Leu Ser Asp Thr Leu Lys Leu Trp Asn Thr
 165 170 175
 30 His Glu Asp Trp Glu Asn Glu Glu Arg Asn Ile Val Leu Thr Leu Ala
 180 185 190
 Arg Ile Trp Tyr Ser Thr Glu Thr Gly Gly Ile Val Pro Lys Asp Val
 195 200 205
 35 Ala Ala Glu Trp Val Leu Glu Arg Leu Pro Ala Glu His Lys Pro Ile
 210 215 220
 Leu Val Glu Ala Arg Gln Ala Tyr Leu Gly Leu Cys Lys Asp Ser Leu
 40 225 230 235 240
 Ala Leu Arg Ala Asp Glu Thr Ser Ala Phe Ile Gly Tyr Ala Lys Ser
 245 250 255
 45 Ala Val Ala Asp Leu Leu Glu Lys Arg Lys Ser Gln Thr Ser His Ile
 260 265 270
 Cys Asp Gly Ala Lys Asn Val
 275

50

<210> 9

<211> 570

<212> DNA

55 <213> Corynebacterium glutamicum LP-6

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(567)

<223> tetR

<400> 9

5	atg gct cag aaa caa gcg cga ctc gat cgt gca gca gtc ttg cgc ggt	48
	Met Ala Gln Lys Gln Ala Arg Leu Asp Arg Ala Ala Val Leu Arg Gly	
	1 5 10 15	
10	gcg agg cat gtg ctc aat aac acg ggg atc gac ggt ttc acc aca cgg	96
	Ala Arg His Val Leu Asn Asn Thr Gly Ile Asp Gly Phe Thr Thr Arg	
	20 25 30	
15	gcg ctg gct gcg cat ctg cgg gtg cag cag cca gcg ctc tac tgg cac	144
	Ala Leu Ala Ala His Leu Arg Val Gln Gln Pro Ala Leu Tyr Trp His	
	35 40 45	
20	ttt cgg aca aag gcc cac ctg ctc gga tgc ctc gca gct gat gtg ctt	192
	Phe Arg Thr Lys Ala His Leu Leu Gly Ser Leu Ala Ala Asp Val Leu	
	50 55 60	
25	gat cgc gaa cac cac gcc tca ctc cca gag tca ggg gag cgc tgg gac	240
	Asp Arg Glu His His Ala Ser Leu Pro Glu Ser Gly Glu Arg Trp Asp	
	65 70 75 80	
30	gac ttt ctc ctg cgc aac gcg cgg agc ttc cgg aca gcg ctt ctg gca	288
	Asp Phe Leu Leu Arg Asn Ala Arg Ser Phe Arg Thr Ala Leu Leu Ala	
	85 90 95	
35	gtc cgg gat gga gca cgg ctg cac gca gag ttt cac cgt caa aag agt	336
	Val Arg Asp Gly Ala Arg Leu His Ala Glu Phe His Arg Gln Lys Ser	
	100 105 110	
40	gac cag atg cca gcg ggc tgc gat gcc ccc gaa agt cag atc gag ttt	384
	Asp Gln Met Pro Ala Gly Ser Asp Ala Pro Glu Ser Gln Ile Glu Phe	
	115 120 125	
45	ctc gtg tcc gaa gga ttc gct gag ggc tct gcg gtc cga gct ctc atg	432
	Leu Val Ser Glu Gly Phe Ala Glu Gly Ser Ala Val Arg Ala Leu Met	
	130 135 140	
50	gct atc agc cgc tat acg gtc ggt ttc gta cta gaa gaa caa aca gcg	480
	Ala Ile Ser Arg Tyr Thr Val Gly Phe Val Leu Glu Glu Gln Thr Ala	
	145 150 155 160	
55	ctc gac aac gga tgt gag cct gtc gat caa gac cta gat ttc gag ttc	528
	Leu Asp Asn Gly Cys Glu Pro Val Asp Gln Asp Leu Asp Phe Glu Phe	
	165 170 175	
60	ggg tta gtt gca atg gtt gaa ggg ctg gca tca aag cga tga	570
	Gly Leu Val Ala Met Val Glu Gly Leu Ala Ser Lys Arg	
	180 185	

<210> 10

<211> 189

55 <212> TetR-PRT

<213> Corynebacterium glutamicum LP-6

<400> 10

Met	Ala	Gln	Lys	Gln	Ala	Arg	Leu	Asp	Arg	Ala	Ala	Val	Leu	Arg	Gly				
1				5				10					15						
5	Ala	Arg	His	Val	Leu	Asn	Asn	Thr	Gly	Ile	Asp	Gly	Phe	Thr	Thr	Arg			
			20					25					30						
	Ala	Leu	Ala	Ala	His	Leu	Arg	Val	Gln	Gln	Pro	Ala	Leu	Tyr	Trp	His			
			35					40					45						
10	Phe	Arg	Thr	Lys	Ala	His	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Ala	Ala	Asp	Val	Leu			
		50					55					60							
	Asp	Arg	Glu	His	His	Ala	Ser	Leu	Pro	Glu	Ser	Gly	Glu	Arg	Trp	Asp			
15		65				70				75						80			
	Asp	Phe	Leu	Leu	Arg	Asn	Ala	Arg	Ser	Phe	Arg	Thr	Ala	Leu	Leu	Ala			
				85						90					95				
20	Val	Arg	Asp	Gly	Ala	Arg	Leu	His	Ala	Glu	Phe	His	Arg	Gln	Lys	Ser			
				100					105					110					
	Asp	Gln	Met	Pro	Ala	Gly	Ser	Asp	Ala	Pro	Glu	Ser	Gln	Ile	Glu	Phe			
			115					120					125						
25	Leu	Val	Ser	Glu	Gly	Phe	Ala	Glu	Gly	Ser	Ala	Val	Arg	Ala	Leu	Met			
		130					135					140							
	Ala	Ile	Ser	Arg	Tyr	Thr	Val	Gly	Phe	Val	Leu	Glu	Glu	Gln	Thr	Ala			
30		145				150					155					160			
	Leu	Asp	Asn	Gly	Cys	Glu	Pro	Val	Asp	Gln	Asp	Leu	Asp	Phe	Glu	Phe			
				165						170					175				
35	Gly	Leu	Val	Ala	Met	Val	Glu	Gly	Leu	Ala	Ser	Lys	Arg						
			180						185										

40

Patentansprüche

1. Miteinander kompatible Plasmide pTET3 und pCRY4,
isoliert aus dem unter der Nummer DSM 5816
hinterlegten Stamm von *Corynebacterium glutamicum*,
5 wobei das Plasmid pTET3 charakterisiert ist durch
 - 1.1 eine Länge von ~ 27,8 kbp und die in Abbildung 1
dargestellte Restriktionskarte,
 - 1.2 eine Replikationsregion mit der
Nukleotidsequenz, dargestellt in SEQ ID No. 1,
10 und eine
 - 1.3 Antibiotikaresistenzregion, bestehend aus einem
Tetracyclinresistenz-vermittelnden tetA-Gen und
einem Streptomycin- und Spectinomycinresistenz-
vermittelnden aadA-Gen, dargestellt in SEQ ID
15 No. 6,und das Plasmid pCRY4 charakterisiert ist durch
 - 1.4 eine Länge von ~ 48 kbp und die in Abbildung 2
dargestellten Restriktionskarte und
 - 1.4 eine Replikationsregion mit der
Nukleotidsequenz, dargestellt in SEQ ID No. 4,
20 enthält.
2. Zur autonomen Replikation in coryneformen Bakterien
befähigte zusammengesetzte Plasmide (composite
plasmids), enthaltend
 - 2.1 einen Teil oder die Gesamtmenge der
25 Nukleotidsequenzen dieser Plasmide

- 2.2 zumindest eine DNA-Replikationsregion, die sich von einem der Plasmide pTET3 oder pCRY4 ableitet (derived from)
- 2.3 ein Genfragment, das sich von einem Plasmid aus E. coli, B. subtilis oder Streptomyces ableitet und sich dort vermehren kann und
- 2.4 mindestens eine Region für die Expression einer Wirkstoffresistenz.
3. Zusammengesetzte Plasmide gemäß Anspruch 2, die die Wirkstoffresistenz(en) aus dem Plasmid pTET3 enthalten.
4. Zusammengesetzte Plasmide gemäß Anspruch 3, die Teile oder die Gesamtmenge der Nukleotidsequenzen der Plasmide pGA1 und/oder pGA2 enthalten.
5. Zusammengesetzte Plasmide gemäß Anspruch 2, die mindestens ein DNA-Fragment enthalten, das für ein Gen aus dem Biosyntheseweg eines Vitamins, eines Nukleotids oder einer L-Aminosäure kodiert und in coryneformen Bakterien exprimiert wird.
6. Zur autonomen Replikation in coryneformen Bakterien befähigte Plasmidvektoren, enthaltend
- 6.1 zumindest eine Replikationsregion, die sich von einem der Plasmide pGA1, pGA2, pTET3 oder pCRY4 ableitet,
- 6.2 mindestens eine Wirkstoffresistenz aus dem Plasmid pTET3 und gegebenenfalls

6.3 mindestens ein DNA-Fragment, das für ein Gen aus dem Biosyntheseweg eines Vitamins, eines Nukleotids oder einer L-Aminosäure kodiert und in coryneformen Bakterien exprimiert wird.

5 7. Plasmidvektor pSELF3-1, der eine Länge von ~ 7,0 kbp aufweist und dessen Restriktionkarte in Abbildung 6 wiedergegeben wird.

8. Plasmidvektor pSELF1-1, der eine Länge von ~ 7,3 kbp aufweist und dessen Restriktionskarte in Abbildung 7
10 wiedergegeben wird.

9. Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, insbesondere L-Lysin oder L-Threonin, durch Fermentation von coryneformen Bakterien,
d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
15 daß man Stämme einsetzt, in denen ein oder mehrere Plasmidvektor(en) gemäß den Ansprüchen 2 bis 7 enthalten sind (ist).

10. Verfahren zur Herstellung von Vitaminen, insbesondere D-Pantothensäure durch Fermentation von coryneformen Bakterien,
20 d a d u r c h g e k e n n z e i c h n e t,
daß man Stämme einsetzt, in denen ein oder mehrere Plasmidvektor(en) gemäß den Ansprüchen 7 und 8 enthalten sind (ist).

25

Plasmide aus *Corynebacterium glutamicum* und deren Verwendung

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft die miteinander kompatiblen Plasmide
5 pTET3 und pCRY4, isoliert aus dem unter der Nummer DSM5616
hinterlegten Stamm von *Corynebacterium glutamicum*, wobei
das Plasmid pTET3 charakterisiert ist durch

- 1.1 eine Länge von ~ 27,8 kbp und die in Abbildung 1
dargestellte Restriktionskarte,
- 10 1.2 eine Replikationsregion mit der Nukleotidsequenz,
dargestellt in SEQ ID No. 1, und eine
- 1.3 Antibiotikaresistenzregion, bestehend aus einem
Tetracyclinresistenz-vermittelnden tetA-Gen und
einem Streptomycin- und Spectinomycinresistenz-
15 vermittelnden aadA-Gen, dargestellt in SEQ ID No.
6,

und das Plasmid pCRY4 charakterisiert ist durch

- 1.4 eine Länge von ~ 48 kbp und die in Abbildung 2
dargestellte Restriktionskarte und
- 20 1.5 eine Replikationsregion mit der Nukleotidsequenz,
dargestellt in SEQ ID No. 4,

aus diesen Plasmiden zusammengesetzte Plasmidvektoren, die
in coryneformen Bakterien autonom replizieren können und
Verfahren zur Herstellung von L-Aminosäuren, Vitaminen und
25 Nukleotiden unter Verwendung dieser Bakterien.

Abbildung 1:

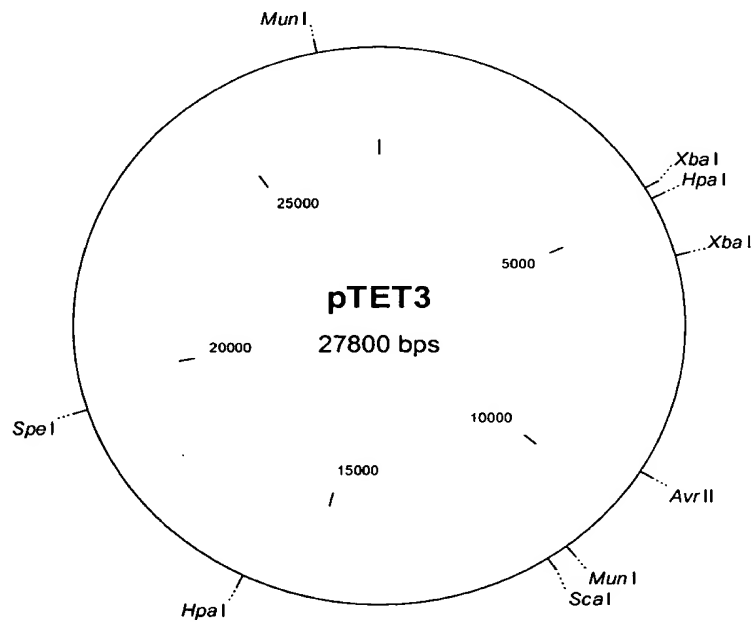


Abbildung 2:

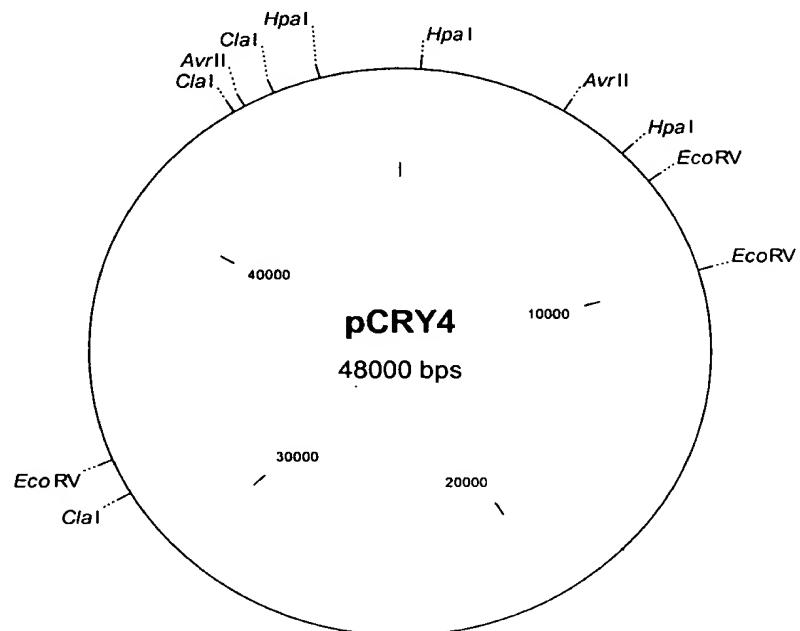
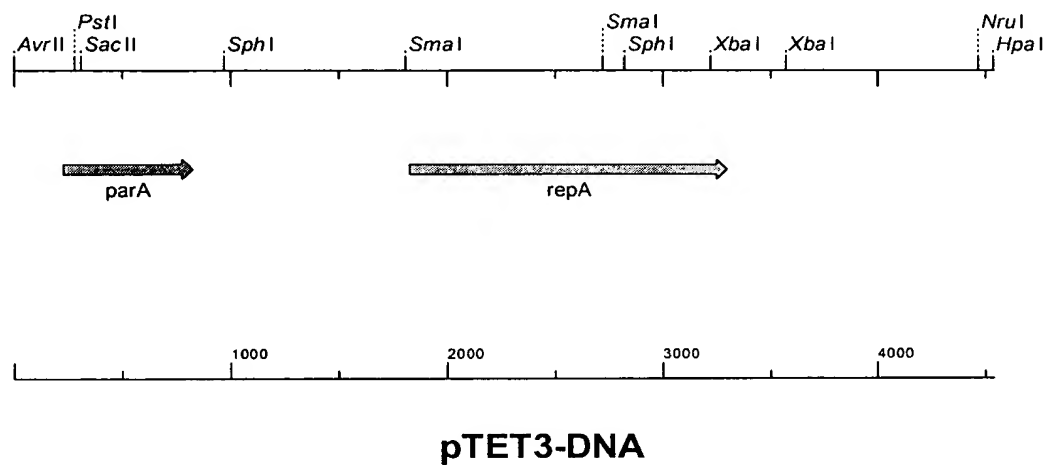
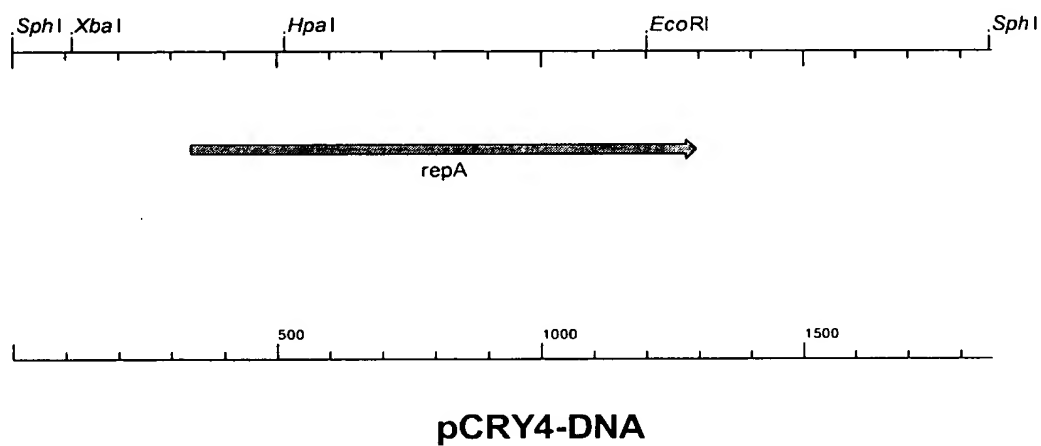


Abbildung 3:



5

Abbildung 4:



10

Abbildung 5:

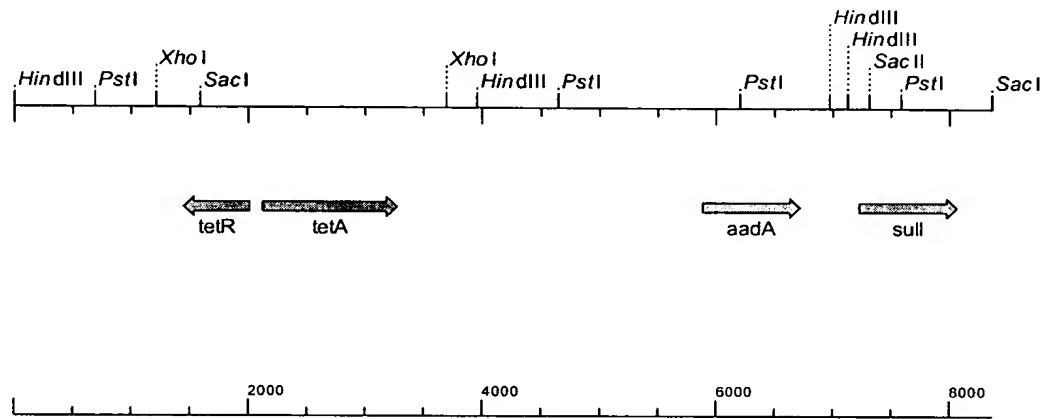
**pTET3-DNA**

Abbildung 6:

5

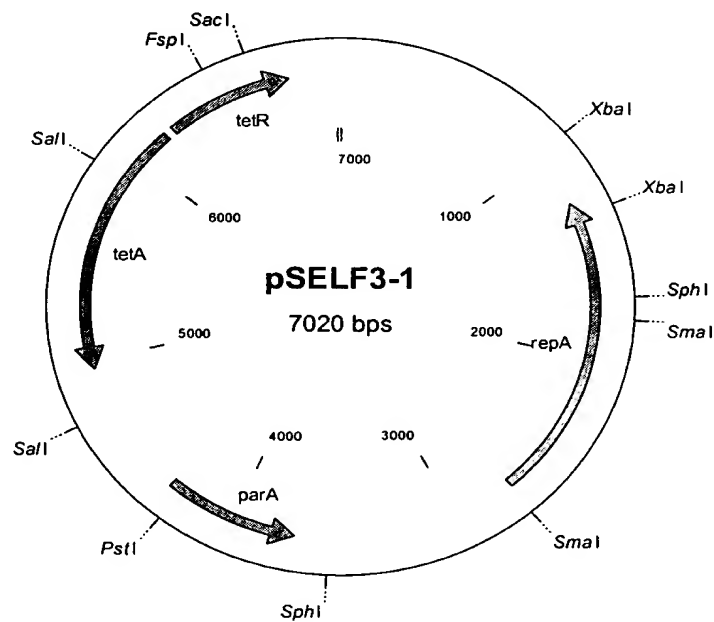


Abbildung 7:

